

**Aus der Poliklinik für Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**Adhäsionsmoleküle auf zirkulierenden humanen Monozyten bei essentieller
Hypertonie**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin**

von

**Dipl. Ing. Susan Katrin Lau
aus Rostock**

Dekane: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Schreiber
2. Prof. Dr. R. Ewert
3. PD Dr. med. Y. Dörffel

Datum der Promotion: 22.11.2004

Zusammenfassung

HINTERGRUND: Das Ziel dieser Studie bestand darin, die mögliche Rolle von zirkulierenden humanen Monozyten in der Pathologie der essentiellen Hypertonie zu untersuchen. Wir verglichen die Expressionsmuster unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle auf isolierten Monozyten des peripheren Blutes von Normalkontrollen und Hypertonikern. Wir bestimmten die Veränderungen durch Stimulation mit Lipopolysaccharide (LPS), Angiotensin II (AT) und agonistische Angiotensin Rezeptor Typ I-Autoantikörper (AT1-AK) sowie den Einfluß des AT1-Rezeptor-Antagonist Losartan und des auch an MAC-1 bindenden Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor-Antikörper Abciximab. **METHODIK:** Blutproben von 18 Patienten mit essentieller Hypertonie und 20 gesunden Normalkontrollen wurden verglichen. Die Monozyten wurden mittels Dynabead-Negativ-Isolierung gewonnen. Die Adhäsionsmolekül-Expression wurden nach Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD11a, CD11b, CD29, CD31, CD44, CD49d, CD54 und CD62L mittels FACS Messung bestimmt. **ERGEBNISSE:** Auf Monozyten hypertensiver Patienten ist die Expression von CD11a, CD11b und CD54 signifikant erhöht. Mit Inkubation erhöht sich die Expression von CD54 und CD44, während CD11b, CD31 und CD49d erniedrigt werden und CD11a konstant bleibt. LPS-Stimulation führt zu einer signifikanten Erhöhung der CD11b und CD54 Expression. Ausdruck der Aktivierung durch AT-Stimulation ist eine erhöhte CD11b Expression. AT1-AK erhöhen die Expression von CD11b, CD54 und CD49d signifikant. Losartan verringert nur tendenziell und teilweise die AT und AT1-AK bedingten Expressionsveränderungen. Der LPS bedingte Anstieg der CD11b Expression auf Monozyten wird durch Abciximab vermindert. **SCHLUSSFOLGERUNG:** Wir demonstrieren die Bedeutung von voraktivierten Monozyten bei Hypertonie in der Pathogenese der Arteriosklerose.

Schlagwörter:

- Monozyten , Hypertonie, Adhäsionsmoleküle, Autoantikörper

Abstract

Monocyte expression of adhesion molecules in patients with essential hypertension

BACKGROUND: The purpose of this study was to investigate the possible involvement of human peripheral blood monocytes in the pathology of hypertensive disease. We determined the in vitro expression patterns of adhesion molecules on isolated peripheral blood monocytes from normal controls and from hypertensive patients. We investigated and compared the ability of lipopolysaccharide (LPS), angiotensin II (Ang II) and Agonistic AT1 receptor autoantibodies (AT1-AA) to stimulate monocytes and the influence of preincubation with an Ang II type 1 receptor antagonist (losartan) or Glykoprotein IIb/IIIa rezeptor-antibody Abciximab. **METHODS:** Blood samples were obtained from 18 patients with essential hypertension and from 20 normotensive healthy individuals used as a control group. Peripheral blood monocytes were isolated by negative Dyna Bead Isolation. Adhesion molecules were measured using immunofluorescence of monocytes labelled with antibody against CD11a and b, CD29, CD31, CD44, CD49d, CD54 and CD62L by flow cytometry. **RESULTS:** The expression of CD11a, CD11b and CD54 was significantly higher in hypertensive patients versus healthy individuals directly after isolation. With incubation the expression of CD44 and CD54 was increased and the expression of CD 11b, CD31 and CD49d was decreased, whereas CD11a shows a constant expression. Monocytes showed increased expression of CD11b and CD54 after LPS stimulation. CD11b expression was significantly increased after stimulation with Ang II, stimulation with AT1-AA an increased expression of CD11b, CD54 and CD49. Losartan was partially but not significantly effective in blocking the effects of Ang II or AT1-AA stimulation. Abciximab was reducing the LPS induced CD11b Epression. **CONCLUSIONS:** These data indicate that preactivated monocytes from hypertensives may be of pathogenic importance in atherosclerosis.

Keywords:

- monocytes, hypertension, adhesion molecules, autoantibody

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Die essentielle Hypertonie	8
1.2. Die Immunpathologie der essentiellen Hypertonie	9
1.3. Das Renin- Angiotensin- System in der Pathologie der Hypertonie	10
1.4. Periphere Monozyten	12
1.4.1. Aktivierung peripherer Monozyten	13
1.5. Adhäsionsmoleküle auf Monozyten	14
1.5.1. Familien von Adhäsionsmolekülen	14
1.5.2. Adhäsionskaskade der Monozyten	17
1.5.3. Pathologische Expression	18
1.6. Hypertonie und Arteriosklerose	21
1.6.1. Definition und Bedeutung von Arteriosklerose	21
1.6.2. Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen	21
1.6.3. Ätiologie der Arteriosklerose	22
1.7. Mögliche neue therapeutische Ansätze	25
1.7.1. Beeinflussung des RAS durch AT-1-Rezeptor Antagonisten	25
1.7.2. Der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor Antikörper Abciximab	26
2. Aufgabenstellung	27
3. Methoden	29
3.1. Chemikalien	29
3.2. Einschlusskriterien der Studie	30
3.3. Methoden der Monozytenisolierung	33
3.3.1. Dichte-Gradienten-Zentrifugation	33
3.3.2. Negativ-Isolierung mittels Dynabeads	34
3.3.3. Isolierung mittels Adhäsion an Plastik	35
3.3.4. Monozyten im Vollblut nach Erythrolyse	35
3.4. Monozyten-Stimulation	36
3.5. Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen mittels FACS	38
3.5.1. Meßprinzip	38
3.5.2. Direkte und indirekte Membranimmunfluoreszenz	39

3.5.3. Messung der Adhäsionsmolekülexpression auf Monozyten	40
3.6. Vitalitätsbestimmung	43
3.6.1. Ausschlußfärbung mit Trypanblau	43
3.6.2. Durchflußzytometrische Bestimmung der Vitalität	43
3.7. Methode der mikroskopischen Immunfluoreszenz	44
3.8. Datenanalyse	46
4. Ergebnisse	47
4.1. Methodenevaluation	47
4.1.1. Reinheit und Vitalität der Monozyten nach Isolierung	47
4.1.2. Monozyten im Vollblut	49
4.1.3. Monozyten nach Dichtegradientenzentrifugation	49
4.1.4. Einflußfaktoren auf die FACS Messung	51
4.2. Adhäsionsmoleküle auf Monozyten bei Hypertonie	52
4.2.1 CD54	52
4.2.2. CD11b	54
4.2.3. CD11a	55
4.2.4. CD29	57
4.2.5. CD31	57
4.2.6. CD44	58
4.2.7. CD49d	58
4.2.8. CD62L	59
4.2.9. 9eg7	59
4.3. Einfluß von Stimulation auf die Expression von Monozytenadhäsionsmolekülen	60
4.3.1. Veränderungen durch Inkubation	60
4.3.2. Stimulation mit LPS	62
4.3.2.1. Adhäsionsmolekül-Veränderungen durch LPS	62
4.3.2.2. Einfluß von Abciximab auf LPS stimulierte Monozyten	63
4.3.3. Stimulation mit Angiotensin II und AT1-AK	64
4.3.3.1. Adhäsionsmolekül-Veränderungen durch Angiotensin II	64
4.3.3.1. Adhäsionsmolekül-Veränderungen durch AT1-Rezeptor Antikörper	64
4.3.3.3. Einfluß von Losartan auf AT bzw. AT1-AK stimulierte Monozyten	66
4.3.4. Unterschiede der Stimulation bei Hypertonie versus Normalkontrollen	67
5. Diskussion	70
5.1. Effekte von Monozytenisolierung und Inkubation auf die Adhäsionsmoleküle	70

5.2. Analyse möglicher Einflußfaktoren	72
5.3. Veränderte Adhäsionsmoleküle bei Hypertonie	74
5.4. Einfluß von Aktivatoren auf die Expression von Monozytenadhäsionsmolekülen	78
5.4.1. LPS	78
5.4.2. Angiotensin II.....	79
5.4.3. Autoantikörper gegen den AT1-Rezeptor	82
5.5. Bedeutung von Tissue Faktor in der Angiotensin-induzierten Adhäsion	84
5.6. Wirkung von Abciximab auf MAC-1 isolierter Monozyten.....	85
6. Zusammenfassung.....	88
7. Abkürzungsverzeichnis	92
8. Literaturverzeichnis.....	94
9. Danksagung.....	106
Eidesstattliche Versicherung	107

1. Einleitung

1.1. Die essentielle Hypertonie

Nach internationaler Übereinkunft ist die oberste Grenze des normalen Blutdrucks mit systolisch 140 mmHg und diastolisch 90 mmHg festgelegt (JNC-VI 1997, Tab. 1). Dieser Grenzwert ist zwar willkürlich, reflektiert jedoch das Ansteigen kardiovaskulären Folgekrankheiten. Im Unterschied dazu fügte die JNC-VII die neue Kategorie der „Prähypertension“ hinzu und kombinierte die Stadien II und III (JNC-VII 2003). Patienten mit „Prähypertension“ (130/80 bis 139/89 mmHg) haben ein doppelt so hohes Risiko, einen Bluthochdruck zu entwickeln.

Kategorie	systolischer Blutdruck (mmHg)	diastolischer Blutdruck (mmHg)
optimal	<120	<80
normal	<130	85
hochnormal	130-139	85-89
Milde Hypertonie (Stadium I)	140-159	90-99
Mäßige Hypertonie (Stadium II)	160-179	100-109
Schwere Hypertonie (Stadium III)	≥180	≥110

Tabelle 1: Klassifikation des Blutdrucks für Erwachsene nach JNC-VI (Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, 1997)

Die Variabilität des Blutdrucks ist bedingt durch tageszeitliche Biorhythmik, hormonelle, psychische und physische Einflußfaktoren außerordentlich hoch. Voraussetzung für die Diagnosestellung sind deshalb mehrfache, zu unterschiedlichen Tageszeiten und an verschiedenen Tagen gemessene Blutdruckwerte über 140/90 mmHg. Liegen die Gelegenheitsblutdruckwerte 3 Monate nach Erstdiagnose noch im Bereich der milden Hypertonie, so ist vor einer medikamentösen Hochdrucktherapie eine Verifizierung durch ambulante monitorisierte Blutdruckmessung über 24 h zu fordern (Scholze 1999).

Bluthochdruck gehört heute zu den häufigsten Erkrankungen in der westlichen Welt. In den USA geht man von 50 Millionen, in Deutschland von 16 bis 20 Millionen Patienten aus, von denen 10 Millionen ärztlich behandelt werden (JNC-VII, Deutsche Hochdruckliga 2003, Scholze 1999). Gut 95 % aller Hypertonien sind essentiell bzw. primär, was beinhaltet, daß keine organische

Ursache feststellbar ist. In dieser Arbeit wird unter dem Begriff Hypertonie die essentielle Hypertonie verstanden.

Das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen verdoppelt sich ausgehend von 115/75 mmHg mit jeder Blutdruckerhöhung um 20/10 mmHg (JNC-VII 2003). Auch innerhalb des als normal angesehenen Bereiches sinkt das kardiovaskuläre Risiko mit sinkendem Blutdruck und umgekehrt. Einen Schwellenwert gibt es anscheinend nicht. Statistiken in den USA zeigen, daß schon bei einem „normalen“ Blutdruck von 130/90 mmHg die Lebenserwartung je nach Alter und Geschlecht zwischen $\frac{1}{2}$ bis 4 Jahren gegenüber vergleichbaren Personen mit Blutdruckwerten unter 130/90 mmHg reduziert ist (Dörffel 2002). International orientiert man sich daher immer stärker am individuellen Risikoprofil des Patienten. Analog zur JNC-VI und JNC-VII hat die WHO eine Stratifizierung der Patienten anhand ihrer kardiovaskulären Risikosituation vorgenommen, wonach sich Empfehlungen zu Pharmakotherapie und zu Blutdruck-Zielwerten orientieren (WHO/ISH 1999, Deutsche Hochdruckliga 2002, Scholze 1999). Es wird geschätzt, daß bei Hypertonie Stadium 1 mit zusätzlichem kardiovaskulären Risikofaktoren eine Verringerung des systolischen Blutdrucks um 12 mmHg über 10 Jahre einen Todesfall bei 11 behandelten Patienten verhindert (JNC-VII).

1.2. Die Immunpathologie der essentiellen Hypertonie

Die Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie beinhaltet u. a. eine Fehlregulation des Kreislaufes auf Grund verschiedenster Faktoren wie z.B. einer gesteigerten Aktivität des Renin-Angiotensin- Systems, einer veränderten Nierenfunktion, einer gesteigerten sympathischen Aktivität, Abnormitäten der Volumenregulation und endotheliale Dysfunktion mit verstärkter Vasokonstriktion. Dabei mehren sich die Hinweise auf immunologische Veränderungen bei Hypertonie. Berichtet wird von erhöhten Serum-Immunglobulinspiegeln, Alterationen der zellulären Immunfunktion und Abnormitäten des Komplementsystems (Luther et al. 1997).

Es wird vermutet, daß autoimmune Mechanismen eine Rolle in der Pathogenese essentieller Hypertonie spielen. Bei maligner Hypertonie fanden Hilme et al. 1993 spezifische Autoantikörper. Agonistische Autoantikörper gegen den alpha-1-adrenergen Rezeptor vom IgM Typ sind bei Patienten mit primärer, sekundärer sowie maligner Hypertonie in höherem Prozentsatz beschrieben (Luther et al. 1997). Wallukat et al. 1999 und Homuth et al. 2000 entdeckten Autoantikörper gegen den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1-AK) im Serum von

Patientinnen mit Präeklampsie. Homuth et al. 2001 und Fu et al. 2000 belegten, daß diese Antikörper auch bei Patienten mit maligner Hypertonie nachweisbar sind. AT1-AK Stimulieren die AT1-Rezeptoren und initiieren eine Signalkaskade, die zur Expression von Tissue Faktor in den glatten Muskelzellen von Koronararterien und auf Monozyten führt (Dechend et al. 2000). Die zirkulierenden Antikörper sind vom IgG Typ und wirken agonistisch an den vaskulären AT1-Rezeptoren, wobei sie Protein-Kinase-C vermittelt für den Blutdruckanstieg bei Präeklampsie und die Endorganschäden verantwortlich scheinen. Eine immunsuppressive Behandlung mit Glukokortikoiden vermindert die vaskulären Schäden im Tiermodel (Homuth et al. 2001). Um die Bedeutung dieser agonistischen Antikörper in der Pathogenese der Hypertonie zu verstehen, wurde ihr Einfluß auf die Adhäsionsmoleküle auf Monozyten untersucht.

1.3. Das Renin- Angiotensin- System in der Pathologie der Hypertonie

Die Regulation von Blutdruck-, Salz- und Flüssigkeitshomöostase wird durch das Renin-Angiotensin-System (RAS) wesentlich beeinflusst. Angiotensin II (AT) ist das Endprodukt nach Spaltung seiner Vorstufen Angiotensinogen und Angiotensin I durch Renin und Angiotensin Converting Enzyme (ACE). Die Bildung von AT wird endokrin über Reninfreisetzung aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere reguliert und autokrin- parakrin im jeweiligen Gewebe.

AT steigert den Tonus der glatten Muskulatur der Widerstandsgefäße und führt so zu Vasokonstriktion. An der Nebenniere bewirkt AT über Aldosteronfreisetzung einen Blutdruckanstieg, an der Niere führt die Vasokonstriktion zu verminderter Filtration, Katecholamine werden aus sympathischen Synapsen verstärkt ausgeschüttet, das Durstgefühl ist gesteigert. Das zirkulierende Renin- Angiotensin- System mit seiner blutdruckregulatorischen und Aldosteron-stimulierenden Rolle war für Dekaden die übliche Betrachtungsweise. Gegenwärtig haben die Erkenntnisse von AT und seiner Funktion bei Zellproliferation, Hypertrophie und Immunmodulation die Aufmerksamkeit auf die lokale AT Generation und Effekte fokussiert (Bader et al. 2000, Luft 2001, Lang et al. 2000). AT ist ein Wachstumsfaktor im Proliferationsprozeß des vaskulären Bindegewebes sowie der glatten Muskelzellen von Gefäßen und Herzmuskelzellen. AT verstärkt die Makrophagen-Lipidoxidation (Keidar et al. 1998). Es verändert die vaskuläre Remodulation, bedingt eine erhöhte Protein-Synthese in glatten Muskelzellen der Gefäßmedia und führt über verstärkte Synthese von Kollagen Typ I und III in Fibroblasten zu einer Verdickung der Gefäßwände (Muller et al. 2001). Eine Vielzahl

von klinischen, experimentellen und genetischen Daten belegen entsprechend die Verbindung des RAS zur Pathogenese von Hypertonie und der Atherosklerose (Kranzhöfer et al. 1999).

Die biologische Wirkung von AT wird durch Stimulation von Angiotensin-II-Rezeptoren vermittelt. Dabei sind mehrere Rezeptortypen bekannt, welche im gesamten Körper vorkommen. Die etablierten biologischen Wirkungen des RAS werden durch den G-Protein gekoppelten AT1-Rezeptor vermittelt. Der AT2-Rezeptor besitzt antiproliferative Eigenschaften und beeinflusst die Differenzierung von Nervenzellen (deGasparo et al. 2000).

Während das ACE von der Endothelzellmembran exprimiert wird, liegt der AT1-Rezeptor in hoher Dichte in den glatten Muskelzellen der Gefäßmedia und auf Monozyten vor (Nickening et al. 1997, Hahn et al. 1994). Die Expression des AT1-Rezeptors ist variabel und die Rezeptordichte bestimmt die biologische Antwort auf eine AT Stimulation. AT moduliert die Rezeptorexpression durch ein negatives feedback in vivo und in vitro (Homuth et al. 2000). Das bedeutet, ein hoher AT Spiegel führt zu einer verminderten Expression des vaskulären AT1-Rezeptors. Dagegen führen LDL und Insulin zu einer signifikanten Hochregulation der AT1-Rezeptoren und somit zu einer erhöhten vasokonstriktorisches Wirkung des AT (Nickening et al. 1997). Wallukat et al. 1999 berichtet, daß bei Präeklampsie eine geringere Menge AT für einen identischen Blutdruckanstieg notwendig ist. Die Fehlregulation des AT1-Rezeptors ist ein möglicher Schlüsselmechanismus in der Pathogenese von Hypertonie und Arteriosklerose. Dabei scheint eine erblich bedingte Prädisposition für die Dysregulation des AT1-Rezeptors zu bestehen.

Das vasoaktive Peptid AT, welches im allgemeinen in die Regulation des Gefäßtonus und der Natrium Homöostase involviert ist, kann auch inflammatorische Prozesse in menschlichen Monozyten und Endothelzellen aktivieren. Genauso wie TNF α und LPS ist AT ein inflammatorischer Stimulus zur Expression von NF κ B in isolierten menschlichen Monozyten (Kranzhöfer et al. 1999, Muller et al. 2001, Theuer et al. 2002). NF κ B ist für erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel zuständig. AT-Stimulation bei Hypertonie bewirkt eine erhöhte Sekretion von IL-1 (Dörffel et al. 1999) und eine erhöhte Infiltration der Intima mit Monozyten/Makrophagen (Fucal et al. 1999). AT stimuliert die Proliferation von Lymphozyten und reguliert die zelluläre Immunantwort (Luft 2001).

In einer Subpopulation von Ratten-Monozyten wurde die Expression von Renin nachgewiesen, humane Monozyten arteriosklerotischer Plaques enthalten große Mengen AT (Potter et al. 1998). Monozyten stellen somit ein potientes Reservoir für Renin und AT im Gewebe dar und verfügen über AT1-Rezeptoren (Hahn et al. 1994), was eine lokale Bildung und Wirkung von AT ermöglicht (Lang et al. 2000).

1.4. Periphere Monozyten



Abbildung 1 : Monozyt im Blutaussstrich

Vollblut enthält ca. $0.5-1 \cdot 10^7$ Leukozyten pro ml, wovon ca. 34 bis 70% segmentkernige Granulozyten und 12-50 % Lymphozyten sind. Blutmonozyten stellen 3 bis 15 % der zirkulierenden weißen Zellen (Fritsch 1998). Zirkulierende Monozyten sind die größten Blutzellen mit einem Durchmesser von 15 bis 18 μm . Der große nierenförmige Kern nimmt etwa das halbe Zellvolumen ein und ist etwas dezentral gelegen (Abb.1). Ihre zytoplasmatischen Granula sind feiner als bei neutrophilen Granulozyten und besitzen eine geringere Peroxidase-Aktivität. Monozyten können Organismen sowie Tumorzellen aktiv phagozytieren und zeigen Adhäsion an Glas- und Plastikoberflächen. Zirkulierende Monozyten sind sehr heterogen bezüglich ihrer Größe, Dichte, Form und der präsentierten Oberflächenantigene.

CD14-Rezeptoren für lipoproteinbindendes Protein, welches im Serum vorhanden ist und gramnegative Bakterien umhüllt (Roitt et al. 1998), scheinen spezifisch für Monozyten zu sein. Viele andere Markermoleküle der Monozytenoberfläche werden auch von anderen Blutzellen exprimiert (z.B. HLA-DR II Moleküle, Fc- Rezeptoren und Komplement- Rezeptoren).

Die Halbwertszeit zirkulierender Monozyten im Blut beträgt zwischen 8 h und 72h. Dabei bewegen sich Monozyten vorwiegend (80%) in den Randgebieten, so daß Messungen des axialen Monozytenpools die Anzahl der zirkulierenden Monozyten fast fünffach unterschätzen.

Entzündungen stimulieren die Monozytopoese. Monozyten sind zur transepithelialen Diapedese fähig und transformieren kurz nach Verlassen des Blutes in Makrophagen.

Die Bedeutung von Monozyten in der Pathologie von Hypertonie und Arteriosklerose ist von großem Interesse. Monozyten sind an jeder Phase der Atherogenese beteiligt (Ross et al. 1999). Bei Hypertonie ist die Anzahl zirkulierender Monozyten erhöht (Mills et al. 2002) und Dörffel et al. 1999, 2001 postuliert voraktivierte Monozyten. Bataillard et al. 1995 konnte zeigen, daß die Gabe eines Monozytentoxins den Hypertoniegrad bei Ratten reduziert. Ziel dieser Studie ist deshalb die Untersuchung der Adhäsionsmolekülexpression auf Monozyten als Ausdruck von Aktivierung bei verändertem Immunsystem und als Bindeglied zur Atherosklerose.

1.4.1. Aktivierung peripherer Monozyten

Durch den Kontakt mit z.B. Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Produkten wie Lipopolysaccharid (LPS) werden Monozyten aktiviert und sezernieren proentzündliche Mediatoren. Die Aktivierung von Monozyten führt zu erhöhter Expression von Oberflächen-Rezeptoren wie z.B. Integrinen. Die bei Aktivierung aus Monozyten gebildeten Makrophagen sind Antigen-präsentierende Zellen, sezernieren Zytokine, hydrolytische Enzyme und phagozytieren.

Stimulation von Monozyten durch LPS ist eine etablierte Methode um die Aktivierbarkeit von Monozyten zu testen und führt zu erhöhten TNF α und IL-1 Produktion in Monozyten (Dörffel et al. 1999). Diese Zytokine erhöhen die Adhäsion von Neutrophilen über eine erhöhte Expression von ICAM 1 auf der luminalen Oberfläche von Gefäßendothelzellen.

Wir untersuchten, inwiefern Monozytenaktivierung durch LPS zur Änderung des Musters der Adhäsionsmolekülexpression auf Monozyten führt. LPS ist Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien und wird von lebenden und wachsenden Bakterien abgegeben. Ein Abtöten der Bakterien durch antimikrobielle Medikamente kann zusätzlich LPS freisetzen. Die Erzeugung von Zytokine durch Zellwandkomponenten wie LPS vermittelt die biologischen Antworten bei bakteriellen Infektionen.

1.5. Adhäsionsmoleküle auf Monozyten

1.5.1. Familien von Adhäsionsmolekülen

Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems und zwischen Zellen und Endothel erfolgt mittels zweier Mechanismen: das eine Kommunikationssystem wird von löslichen Faktoren wie Zytokinen bereitgestellt. Der zweite Mechanismus ist die Interaktion von Zellen über direkten Zellkontakt. Dieser wird über Ligand-Rezeptor-Bindung von Oberflächenmolekülen, den sogenannten Adhäsionsmolekülen, geregelt.

Entsprechend ihrer Struktur werden Adhäsionsmoleküle in verschiedenen Familien unterteilt: die Immunglobulin-Superfamilie, die Selektine, die Integrine und weitere (z.B. CD44).

Die Immunglobulin-Superfamilie ist sehr divers und enthält mehr als 70 Oberflächenmoleküle, darunter sowohl Adhäsionsmoleküle (CD2, CD31, LFA3, ICAM1, ICAM3, VCAM1, NCAM1, MAdCAM1), als auch Non-Adhäsionsmoleküle (Ig, TCR, CD3, CD4, CD8, MHC). Kriterium für die Zugehörigkeit ist das Vorhandensein von mindestens einer Immunglobulin-Domäne. Liganden können die Moleküle selbst sein, andere Vertreter der Ig-Superfamilie (CD2/LFA3) oder Integrine und Selektine. Wichtigste Funktionen sind das "homing" zu Lymphorganen, die Migration in Entzündungsgebiete und die Co-Stimulation bei zellulärer Aktivierung.

ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1= CD54) ist ein Adhäsionsrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie, der konstitutiv auf Endothelzellen und Monozyten vorkommt und bei Aktivierung der Zelle mit IL-1 oder TNF- α durch Neusynthese stark hochreguliert wird. Spitzenwerte werden auf Endothelzellen nach 24 h erreicht. Durch starke Bindung an die β 2-Integrine wird die Leukozytenadhäsion bewirkt. ICAM-1 fungiert an Schleimhautepithelzellen als Rezeptor für Rhinoviren und als Rezeptor für Plasmodium-falciparum-infizierte Erythrozyten. Erhöhte Expression ist zum Beispiel beim Melanom mit einem erhöhtem Metastasierungsrisiko verbunden. Auf Monozyten besitzt ICAM-1 eine zusätzliche Funktion in der Phase des Rollens (Ley 1996).

PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1= CD31) ist ein auf Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen induzierbarer Adhäsionsrezeptor der Ig-Superfamilie, der bei der Bindung von Entzündungszellen am Endothel eine wichtige Rolle spielt. Dabei scheint CD31

insbesondere für die Transmigration von Leukozyten notwendig zu sein. Durch Wechselwirkung mit Integrinen bewirkt PECAM-1 die Leukozytenextravasation.

Selektine sind membrangebundene Glykoproteine, die entsprechend ihrer Ursprungszellen in L- (Leukozyten), E-(Endothel) und P-Selektin (Plättchen und Endothel) eingeteilt werden (Bendas et al. 1999). Der Name leitet sich von den Lektinen ab und weist auf die Bindungseigenschaften dieser Rezeptoren hin, denn Lektin ist eine Sammelbezeichnung für Zucker bindende Proteine. L- und P-Selektine unterliegen einer rapiden Down-Regulation.

Die Induktion der Selektinexpression durch Entzündungsmediatoren steuert Dauer und Intensität des Leukozytenrollens und ordnet gleichzeitig den einzelnen Selektinen unterschiedliche Funktionen zu. Während P-Selektin mit seiner langgestreckten Struktur in Kombination mit L-Selektin in der Frühphase der Entzündung das Zellrollen vermittelt, ist E-Selektin durch seine langsamere Bindungskinetik für die Überleitung zur festen Adhäsion verantwortlich. Alle Selektine existieren auch in einer löslichen Form.

L-Selektin (CD62L) ist konstitutiv auf fast allen Leukozyten-Subtypen vorhanden, wobei es zur besseren Zugänglichkeit auf den Mikrovilli lokalisiert ist. Nach Aktivierung der Leukozyten wird L-Selektin innerhalb weniger Minuten proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten. Mechanismus und Ursache hierfür sind nicht vollständig geklärt, es wird aber eine adhäsionsmodulierende Funktion postuliert. L-Selektin vermittelt auch die Extravasation von Lymphozyten an speziellen Endothelien beim Übergang ins Lymphsystem.

Innerhalb der Gruppe der Integrine existieren wenigstens 15 α - und 8 β -Ketten. Integrine sind Heterodimere, bestehend aus einer nicht kovalent gebundenen α und β Untereinheit und werden abhängig vom Zustand der Aktivierung bzw. Differenzierung unterschiedlich auf Leukozyten-Untergruppen dargestellt. Sie können mehr als einen spezifischen Liganden binden und kommen in verschiedenen Aktivierungszuständen vor.

β 1-Integrine (VLA= very late antigen) vermitteln vorwiegend Zell-Matrix-Adhäsion. α 4 β 1 (CD49d/ CD29) wird auf Lymphozyten und Monozyten exprimiert und kann an VCAM-1 auf Endothelzellen binden und somit zur Initiation von Entzündung beitragen. Auf den meisten adhären Zellen ist VLA-4 nur schwach exprimiert. Das einzige weitere an der Adhäsion von

Leukozyten und Endothel beteiligte $\beta 1$ -Integrin ist $\alpha 6 \beta 1$ (VLA-6), welches wahrscheinlich in der späten Phase der Adhäsion mitwirkt.

$\beta 2$ -Integrine sind für eine Vielzahl immunologischer Vorgänge unentbehrliche Rezeptoren. Sie vermitteln im Rahmen der Entzündung die feste Anhaftung von Lymphozyten und Monozyten an das Endothel, außerdem die Haftung von Effektorzellen an virusinfizierte oder Tumorzellen und somit deren Lyse.

LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen-1 ($\alpha L \beta 2$ = CD11a/CD18)) ist ein auf allen Leukozyten konstitutiv vorkommendes Integrin, das durch Bindung seiner Liganden ICAM-1 und ICAM-2 die Leukozytenadhäsion am Endothel vermittelt.

Der CD11b/CD18 ($\alpha M \beta 2$, MAC-1) Rezeptor ist ein Heterodimer der $\beta 2$ Integrin Familie, das Adhäsion von Neutrophilen und Monozyten an ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) der Endothelzellen u. a. vermittelt. Es wird in Sekretgranula gespeichert und kann bei Aktivierung schnell mobilisiert und an der Zelloberfläche exprimiert werden. Das konstitutionelle Oberflächenexpressionsniveau von CD11b ist relativ niedrig (ca. 50.000 Bindungsstellen pro Zelle) und kann bei Aktivierung schnell auf das ca. 5-fache erhöht werden. Deshalb wird die Bestimmung der CD11b-Oberflächenexpression als Aktivierungsindex von Leukozyten genutzt. MAC-1 wird von natürlichen Killerzellen, Granulozyten, aktivierten Lymphozyten und Monozyten exprimiert. Es kann seine Konfiguration unter Stimulation mit verschiedensten Agonisten (z.B. Adenosin Diphosphat (ADP) und dem bakteriellen Peptid formyl-methionine-leucine-phenylalanine (fMLP)) ändern. Verschiedene Liganden binden an MAC-1 (Opsonin, ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), Fibrinogen, Gerinnungsfaktor Xa). MAC-1 ist bei der Adhäsion und Transmigration durch Endothel und Epithel, bei der Aggregation von Neutrophilen, der Chemotaxis von Neutrophilen und Bindung von opsonierten Teilchen beteiligt.

CD44 ist ein Zelloberflächen-Proteoglykan, das zahlreiche Adhäsionsfunktionen erfüllt: Bindung an Kollagen, Förderung des „Homing“ von Lymphozyten und der Diapedese von Entzündungszellen u.a.m.. CD44 wurden auf neoplastischen Zellen entdeckt und trägt zur Fähigkeit der lymphogenen Metastasierung bei.

1.5.2. Adhäsionskaskade der Monozyten

Die Adhäsion von Monozyten an das Endothel ist die früheste zelluläre Reaktion der Atherogenese. Voraussetzung ist die rezeptorgesteuerte Adhäsion der Leukozyten am Gefäßendothel, die als Adhäsionskaskade (Abb.2) bezeichnet wird. Das mehrstufige Paradigma des Rekrutments inflammatorischer Zellen charakterisiert: Margination, Einfangen, Rollen, Aktivierung, feste Adhäsion und Transmigration (Ley 1996, Muller et al. 1999).

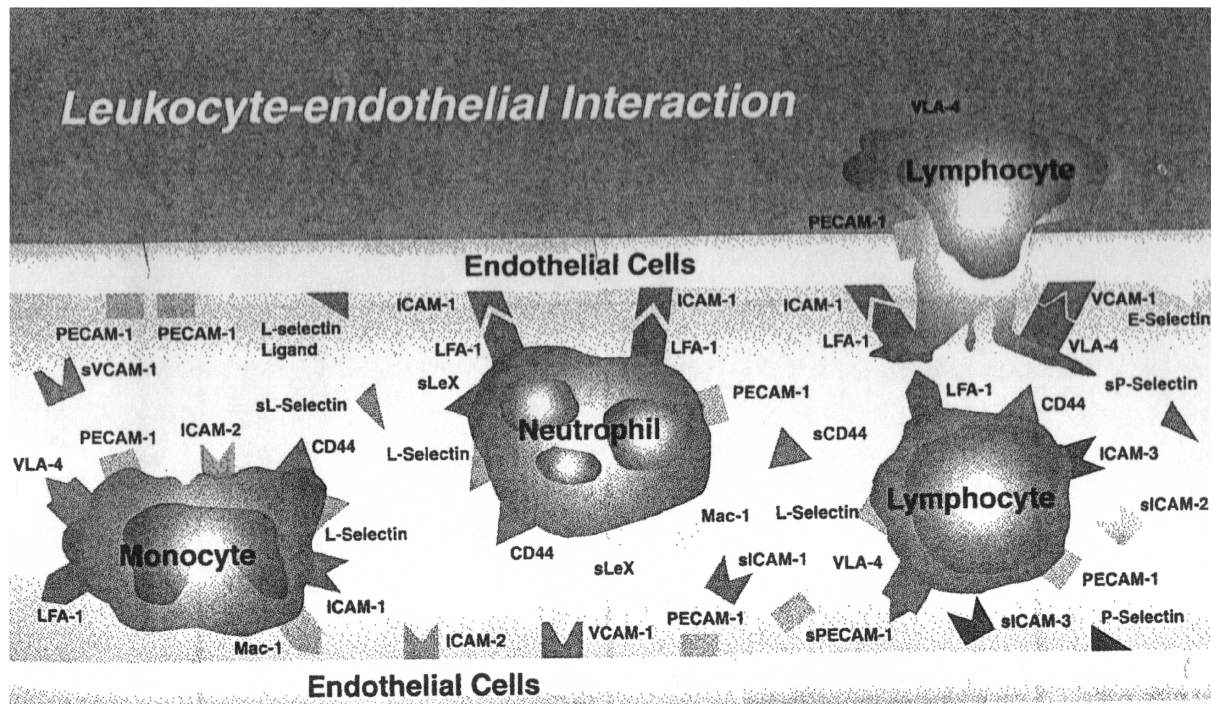


Abbildung 2: Adhäsionskaskade (nach BD Katalog)

Monozyten bewegen sich durch ein passives rheologisches Phänomen vorwiegend nahe dem Endothel (Margination). Nach einem initialen Kontakt fließender Leukozyten kommt es über Selektin vermittelte Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu schwach affinen Bindungen am Gefäßendothel (Capture). L-Selektin bewirkt dabei vorwiegend das Einfangen von Leukozyten aus dem Blutstrom, die Bindungen sind schnell aber instabil (Ley 1996). Luscinskas et al. 1994 berichtet von L-Selektin vermitteltem Monozyten-Rollen. Auf den Endothelzellen führen Thrombin und Histamin nach Minuten zur Freisetzung von P-Selektin, die Zytokine IL-1 und TNF α bewirken eine Expression von E-Selektin nach 3-6 h. Monozyten binden über eine primär schwache Bindung an P- und E-Selektin, um dann, nach einer rollenden Adhäsion in Blutstromrichtung, sich an ICAM-1 und VCAM-1, die nach 12-24 bzw. 6-10 h induziert werden, stärker zu fixieren. Für den Prozeß des langsamen Rollens ist die Interaktion VLA4/VCAM

essentiell, wobei alle Integrine nur nach Konfigurationsänderung aktiv werden (Ley 1996). Die aktivierten Integrine binden die rollenden Leukozyten fest an das Endothel. Dabei sind z.B. Kontakte wie LFA-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1 wesentlich. Die Bindung von Neutrophilen an ICAM-1 erfolgt lt. Hentzen et al. 2000 als kooperativer und sequentieller Prozeß von CD11a/CD18 abhängiger Anheftung gefolgt von CD11b vermittelter Stabilisierung. Auch eine Einbeziehung von VLA-6 in der späten Arrest-Phase wird vermutet. Nach Fixation beginnt die transendotheliale Migration: die Leukozyten werden flach und migrieren durch das Endothel. Für die Migration ist z.B. CD31 notwendig.

1.5.3. Pathologische Expression

Neben ihrer physiologischen Funktion im Immungeschehen wurden auch Dysregulationen der Adhäsionsmolekülexpression z.B. bei myokardialer Ischämie, Arteriosklerose, rheumatoider Arthritis, Asthma, Diabetes mellitus, Ischämie / Reperfusion und eine Beteiligung an der Gewebeinvasion metastasierender Krebszellen beobachtet.

Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder vaskulärem Insult sind erhöhte Adhäsionsmolekül-Konzentrationen im Serum und auf Endothelzellen belegt (Xion et al. 1998). Hypoxie bewirkt eine Zunahme der CD11b-Expression auf mononuklearen Zellen (Scannell et al. 1995). LPS, aber auch LDL, Superoxid-Radikale, Rauchen und Cytomegalie-Virus-Infektion fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (Meniconi et al. 1998). Durch dauerhaft erhöhte Glucosekonzentrationen kommt es zu oxidativem Stress für die Endothelzellen, der zur Exprimierung von E-Selektin und anderen Adhäsionsrezeptoren und somit zur Bindung und Infiltration von Monozyten führt. Lösliche Adhäsionsmoleküle liegen im Serum von Hypertoniepatienten erhöht vor (DeSouza et al. 1997, Dörffel et al. 2000). Außerdem sind Selektine ein wichtiger Faktor bei der Metastasierung von Krebs und vermitteln die Bindung verschiedener metastasierender Krebszellen aus dem Blutstrom an das Gefäßendothel und die anschließende Gewebeinvasion.

Wegen ihrer zentralen Rolle im Entzündungsgeschehen sind die Adhäsionsmoleküle attraktive Targetstrukturen für die Suche nach neuartigen antiinflammatorischen Stoffen. Im Gegensatz zur herkömmlichen symptomatischen Therapie könnte man mit kompetitiven Adhäsionsmolekül-Inhibitoren systematisch in den Prozeß der Leukozyten-Chemotaxis eingreifen. Nahe liegend ist deshalb die Frage, ob ein bestimmtes Muster der Änderung von Adhäsionsmolekülen spezifisch für Bluthochdruck ist.

Eine Zusammenstellung der von Monozyten exprimierten Adhäsionsmoleküle geben Tab.2 und Tab.3, wobei die in dieser Studie bestimmten Adhäsionsmoleküle in fett gedruckter CD Nomenklatur gekennzeichnet sind.

Integrin	β	CD	α	CD Nr.	Liganden	M	Funktion
VLA-1	β1	CD 29	α1	CD49a	Laminin		Rezeptor für Laminin
VLA-2			α2	CD49b	Kollagen		Reguliert Expression von Kollagen
VLA-3			α3	CD49c	Fibronectin,Kollagen		Zell-Zell-Interaktion
VLA-4			α4	CD49d	VCAM-1, Fibronectin	Ja	Leukozyten-Rollen, Adhäsion
VLA-5			α5	CD49e	Fibronectin		Zell-Adhäsion und Migration
VLA-6			α6	CD49f	Laminin	Ja	Zell-Adhäsion und Migration
α 7β1			α7		Laminin		
α 8β1			α8		Unbekannt		
αVβ1			αV	CD51	Fibronectin	Ja	
LFA1	β2	CD	αL	CD11a	ICAM-1, -2,-3	Ja	Leukozyten-Endothel-Interaktion
MAC-1		18	αM	CD11b	ICAM-1, Fibrogen, C3bi	Ja	Adhäsion Monozyten zu Endothel
P150,95			αX	CD11c	C3bi, Fibrinogen		Adhäsion Granulozyt zu Endothel
und weiter wie CD104, CD61, CD41, CD51							

Tabelle 2: Integrine, zusammengehörige α und β Einheit, von Monozyten exprimiert bei M=Ja

Adhäsionsmoleküle auf Monozyten	CD Nr.	Größe	Funktion	Regulation	Liganden
Selektine					
L-Selektin = Leukozyten- adhäsionsmolekül-1	CD62 L	100 kDa	Monozyten-Bindung an Endothel beim Rollen	Konstitutiv, nach Aktivierung herabgeregelt	CD34 GlyCAM-1 MAdCAM-1 (Mucosal Adressin Cell Adhäsion)
Immunglobulin Superfamilie					
ICAM-1 = Intercelluläres Adhäsionsmolekül 1	CD54	90- 115kDa	Adhäsion zu Monozyten aktiviertem Endothel, Extravasion	basale Expression, induzierbar von IFN γ , IL-1, TNF α , LPS	LFA-1 Mac-1
ICAM-2	CD102	55- 65kDa			LFA-1
ICAM-3	CD50	116- 140kDa			LFA-1
PECAM-1 = Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1	CD31	120- 130kDa	Transmigration	Konstitutiv, herabgeregelt bei T-L. nach Aktivierung	PECAM-1, $\alpha V\beta 3$
weitere					
CD44/ H-CAM	CD44	90 kDa	Lymphytenhoming, Zell-Zell-Matrix-Kontakt	konstitutiv	Hyaluronat, Kollagen

Tabelle3: Selektine und Immunglobuline zur Adhäsion auf Monozyten

1.6. Hypertonie und Arteriosklerose

1.6.1. Definition und Bedeutung von Arteriosklerose

Das arterielle Gefäßsystem nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Hypertonie ein. Grundsätzlich muß man das Gefäßsystem sowohl als blutdruckbestimmenden Faktor, wie auch als Zielorgan eines Bluthochdrucks mit den Endpunkten Herzinfarkt und Schlaganfall betrachten (Wambach et al. 1994). Dabei sind Arteriosklerose und Hypertonie verschiedene Krankheitsentitäten und nicht bei jedem Hypertoniker manifestiert sich eine extensive Arteriosklerose.

Die Arteriosklerose ist nach Definition der WHO eine variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen sowie Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. Die Erkrankung tritt in Abhängigkeit der Risikofaktorkonstellation als Mikroangiopathie und Makroangiopathie in unterschiedlichen Organkompartimenten auf. Die Atherosklerose ist ein ungleichmäßig nodulärer Typ der Arteriosklerose.

Die Bedeutung der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen bei bis zu 50% Mortalität als häufigste Todesursache in den industriell hochentwickelten Ländern ist hinreichend bekannt (Wambach et al. 1994). Die Hypertonie gehört zu den führenden Risikofaktoren der Arteriosklerose. In der Framingham Studie wird bei 35-64 jährigen Hypertonikern ein zwei- bis vierfach höheres Risiko, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden, belegt (Kannel et al. 1980). Daraus ergibt sich die dringende Forderung, die pathologischen Grundlagen der Arteriosklerose und ihrer Risikofaktoren zu erforschen, die möglichen Therapieansätze auszuloten und gegebenenfalls Präventionsstrategien zu entwickeln.

1.6.2. Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen

Zur Entstehung der Arteriosklerose existieren mehrere Theorien, deren Ausgangspunkt die endotheliale Dysfunktion ist. Die bekannten klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum und Diabetes mellitus erhöhen den oxidativen Stress in den Endothelzellen und gehen mit einem Verlust der endothelvermittelten Vasodilatation einher (Simon et al. 1999). Dieser Verlust der Stickstoffmonoxid (NO)-vermittelten Gefäßerweiterung ist das Kennzeichen einer "endothelialen Dysfunktion", die

bereits in der Frühphase der Atherosklerose nachweisbar und ursächlich mit dieser Erkrankung verbunden ist.

Im Verlauf der endothelialen Dysfunktion wird infolge veränderter Permeabilität die Grundsubstanz der Intima durch ein fibrinreiches Ödem aufgelockert. Im Blut zirkulierende Lipoproteine (LDL) und Cholesterinester infiltrieren die aufgelockerten Intimastrukturen und lagern sich dort ab. Ein weiteres Kennzeichen atherosklerotischer Gefäße ist eine Endothelzellaktivierung, die durch eine Expression von Adhäsionsmolekülen wie "vascular cell adhesion molecule-1" (VCAM-1), "intercellular adhesion molecule-1" (ICAM-1) und "endothelial-leukocyte adhesion molecule-1" (E-Selektin) charakterisiert ist und eine Ankopplung zirkulierender Leukozyten an das Endothel bewirkt (Nakashima et al. 2000). So ist die endotheliale Adhäsion von Monozyten mit nachfolgender Migration in den subendothelialen Raum ein zentraler Vorgang in der Entwicklung von frühen atherosklerotischen Läsionen. Im subendothelialen Raum transformieren diese Zellen dann zu Makrophagen, die sich durch eine unkontrollierte Aufnahme von oxidiertem LDL über den Scavenger-Rezeptor zu den typischen Schaumzellen entwickeln. Makroskopisch zeigen sich gelbliche, streifenförmige Formationen, die sog. „fatty streaks“ (flache, fettreiche Plaques). Die Intimaläsionen bedingen eine Anlagerung von Thrombozyten, die u. a. PDGF (platelet derived growth factor) freisetzen. Es kommt zu einer Migration von glatten Muskelzellen der Media in die Intima, sowie zu deren Proliferation. Die Muskelzellen bilden Kollagene, Elastin und Proteoglykane in einem Ausmaß, daß die resultierende Intimaverdickung (initiale Sklerosierung) oder gar erste fibröse Plaques sonographisch feststellbar sind.

1.6.3. Ätiologie der Arteriosklerose

Eine Vielzahl von Risikofaktoren für die Entwicklung von Arteriosklerose, wie Hypercholesterinämie, hohes LDL-Niveau, arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum, Alter, männliches Geschlecht, Diät, Bewegungsmangel und Diabetes mellitus wurden identifiziert. Jedoch nur bei einem Drittel der Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist einer der klassischen Risikofaktoren eruierbar. Auch die unterschiedliche Inzidenz und der unterschiedliche Verlauf der Arteriosklerose lassen sich nicht hinreichend durch die kardiovaskulären Risikofaktoren erklären. Deshalb wird über weitere Risikofaktoren spekuliert.

Die Kolonisation von Monozyten und T-Lymphozyten in allen Phasen der Arteriosklerose, das Ausschütten von Entzündungsmediatoren (CRP, Zytokine) und die Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen weisen auf eine inflammatorische und immunogene Natur der Arteriosklerose hin. Zytokine, oxidiertes LDL und möglicherweise auch ein Befall mit *Chlamydia pneumoniae* oder anderen Erregern (Meniconi et al. 1998) bzw. autoimmune Prozesse bewirken eine Entzündung der Gefäßwand mit der Folge einer kontinuierlichen Endothelzellaktivierung.

Auch eine spezifische zellvermittelte Immunantwort könnte einen Beitrag zur Atherogenese leisten. T- und B-Lymphozyten (bis zu 20 %) verstärken die Entwicklung der arteriosklerotischen Läsionen, sind im Unterschied zu Monozyten/ Makrophagen aber nicht unbedingt notwendig für deren Entwicklung (Schmitz et al. 1998, Muller et al. 2001). Neben dem lokal inflammatorischen Prozeß in der Gefäßwand sind auch systemische Zeichen einer entzündlichen Reaktion mit der Entwicklung der Arteriosklerose verbunden (Meniconi et al. 1998). So korrelieren die Plasmaspiegel des C-reaktiven Proteins, des Fibrinogens und die Höhe der Leukozytenkonzentration positiv mit dem Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung. Hinweis auf eine systemische Entzündungsreaktion sind auch erhöhte Akut-Phasen-Proteine bei instabiler Angina pectoris. In der Patientengruppe mit erhöhtem CRP bewirkt ASS eine Risikoreduktion für Myokardinfarkt zusätzlich zu der antithrombotischen Wirkung des Medikamentes (Meniconi et al. 1998).

Die Beteiligung immunologischer Faktoren in der Ätiologie der Arteriosklerose wird durch verschiedenste Studien belegt (Lopes-Virella et al. 1985). Lösliche Immunkomplexe bei chronischer Serumkrankheit in Ratten führen zu arteriosklerotischen Läsionen und zu erniedrigtem HDL-Cholesterin Spiegel. Immunkomplexe können Plättchenaggregation induzieren und somit (z.B. über Serotonin Freisetzung) Monozyten stimulieren. Auch eine Bindung von Immunkomplexen an z.B. durch Virusinfekte verändertes Endothel mit folgender Monozytenaktivierung über Fc-Rezeptoren wird diskutiert. Wick et al. 1995 versteht Arteriosklerose als Autoimmunreaktion gegen Hitze-Schock-Protein-60, das von Endothelzellen in Gebieten mit erhöhtem hämodynamischen Stress exprimiert wird.

Für den Risikofaktor Hypercholesterinämie konnte kürzlich ein inflammatorischer Phänotyp der zirkulierenden Monozyten als spezifisches zelluläres Korrelat assoziiert werden (Schmitz et al. 1998). Diese Monozyten sind durch eine hohe Expression von β 1- und β 2-Integrinen charakterisiert, was ein Hinweis auf eine stärkere Fähigkeit zur Adhärenz an entzündetes Gewebe sein könnte. Es stellt sich die Frage nach entsprechenden Veränderungen der Monozyten bei Hypertonie.

Betrachtet man die Interaktion von Hypertonie und Arteriosklerose, scheint es naheliegend, Mechanismen zu vermuten, die beiden gemeinsam sind. Prädestinierte Orte für Arteriosklerose bei Hypertonie sind die Verzweigungen der Arterien, die auf Grund der besonderen rheologischen Bedingungen hohen Drücken ausgesetzt sind (Dörffel 2002). Allerdings scheint die mechanische Belastung durch Shear-Stress nur ein Faktor im Zusammenhang zwischen Hypertonie und Arteriosklerose zu sein. Hypertoniker mit erhöhtem Reninspiegeln haben ein fünffach höheres Risiko einen Myokardinfarkt zu erleiden (Aldermann et al. 1991). Hypertonie bedingt neben erhöhtem hämodynamischem und oxidativem Stress (Tummala et al. 1999) eine endotheliale Dysfunktion (Vogel et al. 1997), eine erhöhte Adhärenz mononukleärer Zellen, eine verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, vaskuläres Remodeling und verändertes Wachstum der glatten Muskelzellen durch AT.

Zusammenfassend könnte also der arteriosklerotische Gefäßumbau als chronisch-aktive Arteritis unterschiedlicher Ätiologie aufgefaßt werden (Ross et al. 1999). Die mononukleären Phagozyten stehen am Anfang der durch chronische Entzündungsreaktion bei Arteriosklerose ausgelösten Immunkaskade. Die Schädigung normaler Endothelzellen könnte als Konsequenz aktivierter Monozyten erklärbar sein. In diesem Zusammenhang ist auch der Einfluß des belegten kardiovaskulären Risikofaktors der Arteriosklerose, der Hypertonie, als möglicher Prozeß generalisierter Monozytenaktivierung neu zu verstehen.

Die weitere Charakterisierung der zellulären Immunologie von Monozyten bei Hypertonie und bei der Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen könnte neue spezifische Ansatzpunkte für Diagnostik und Therapie eröffnen. Ziel der Hypertoniebehandlung sollte nicht nur die Senkung des Blutdruckes, sondern die Korrektur der vaskulären und folglich auch monozytären Abnormitäten sein.

1.7. Mögliche neue therapeutische Ansätze

1.7.1. Beeinflussung des RAS durch AT-1-Rezeptor Antagonisten

Das RAS und die Wirkung seines aktiven Peptids AT kann auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden. Mit Einführung der ACE-Hemmer in den 80-er Jahren wurde erstmals im Rahmen der Hypertonie-Behandlung die Umwandlung von Angiotensin I zum aktiven AT gehemmt. Bei Hochrisikopatienten, d.h. Menschen älter als 55 Jahren mit Diabetes, Hypertonie oder anderen kardiovaskulären Risikofaktoren, bewirkt die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril eine Reduktion des relativen Risikos für schwere kardiopulmonale Ereignisse um 22% (HOPE Studie, Yusuf et al. 2000). ACE-Hemmer sind deshalb aus der Hypertoniebehandlung nicht mehr wegdenkbar. Dabei galten die positiven Therapieergebnisse sowohl für Normotoniker als auch für Hypertoniker, was die mittlerweile etablierte Ansicht bestätigt, daß die Wirkung von ACE-Hemmern nicht ausschließlich auf die blutdrucksenkende Wirkung der Substanz zurückzuführen ist. Bei Diabetikern sind mikroangiopathische Läsionen reduziert (Kubischek et al. 2000), was die Forderung untermauert, alle unter einem Diabetes Typ II leidenden Patienten ohne Kontraindikation mit einem ACE-Hemmer zu behandeln. Bei für Renin und Angiotensinogen doppelt transgenen Ratten bewirken ACE-Hemmer im Gegensatz zu anderen Blutdruck senkenden Medikamenten eine Verringerung der Gefäßläsionen und der ICAM-Expression auf Endothelzellen (Mervaala et al. 2002). Tierstudien demonstrieren eine reduzierte Monozytenakkumulation bei Behandlung mit ACE-Hemmern (Kranzhöfer et al. 1999).

Gezielter kann mit AT-1-Rezeptorantagonisten wie Losartan auf die AT-Wirkung Einfluß genommen werden. Sie blockieren selektiv die zellmembranständigen AT-1-Rezeptoren und somit nahezu alle physiologischen Wirkungen von AT. Im Gegensatz zu ACE-Hemmern beeinflussen AT-1-Rezeptorantagonisten den Bradikinin-Stoffwechsel nicht und zeigen im klinischen Einsatz ein gutes Verträglichkeitsprofil. Zudem bestehen lokale, organbezogene ACE unabhängige Synthesemöglichkeiten von AT, die nicht durch ACE-Hemmer, aber durch AT-1-Rezeptorantagonisten blockiert werden können (Lang et al. 2000). Dörffel et al. 1999 belegt eine durch Losartan verminderte Adhäsion von Monozyten bei AT-Stimulation. Die durch AT bedingte NF κ B Expression in isolierten menschlichen Monozyten wird durch Losartan geblockt (Kranzhöfer et al. 1999). Wir untersuchen deshalb die Stimulierbarkeit der Adhäsionsmoleküle auf Monozyten durch AT bzw. AT1-AK und die eventuelle Inhibition dieses Effektes durch den AT1-Rezeptor-Antagonisten Losartan.

1.7.2. Der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor Antikörper Abciximab

Klinische Studien zeigen, daß die Blockierung von Integrinen ein neuer, erfolgversprechender Ansatz für die Therapie koronarer Gefäßerkrankungen ist (CAPTURE Study 1997).

Abciximab (ReoPro, Lilly) ist das Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers (7E3) gegen den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor (α IIb β 3, Fibrinogen-Rezeptor) auf Thrombozyten. Über die Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor antagonistische Aktivität wirkt Abciximab als Anti-Thrombozyten-Agenz zur Verhinderung von Plättchen vermittelter Thrombose bei instabiler Angina pectoris und perkutaner Koronarintervention (Frederickson et al. 2000). Die Gabe von Abciximab führt zu einer Risikoreduktion (um 14-64%) für einen Myokardinfarkt bei instabiler Angina pectoris und senkt die Restenose-Rate sowie akute ischämische Komplikationen nach Koronarintervention (Hamm et al. 2000, Adgey et al. 1998).

Im Verlaufe der Entwicklung wurde festgestellt, dass Abciximab mit zwei weiteren Integrin-Rezeptoren reagiert: dem Vitronectin-Rezeptor (α V β 3, CD51/CD61), der auf Plättchen und Endothelzellen exprimiert wird, sowie mit dem „aktivierten“ MAC-1 (α M β 2, CD11b/CD18)-Rezeptor auf Leukozyten (Simon et al. 1997). Die Basis der Kreuzreaktivität von Abciximab ist nicht sicher bekannt, wird aber in einer sowohl in β 3 als auch in α M gefundenen gemeinsamen Metall-Ionen abhängigen Adhäsions-Struktur vermutet.

Abciximab hat eine hohe Affinität zum Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor, wirkt innerhalb von Minuten, besitzt eine extrem kurze Plasma-Halbwertszeit (Frederickson et al. 2000) und eine verlängerte biologische Halbwertszeit bis zu 24 h (Kleimann et al. 1999, Mickelson et al. 1999). Die Plättcheninhibition ist dosisabhängig.

Es ergibt sich die Fragestellung, ob und in welcher Art und Weise Abciximab die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten, insbesondere von CD11b, verändert.

2. Aufgabenstellung

Trotz zahlreicher Hinweise auf immunologische Alterationen bei Hypertonie wurde die Rolle der peripheren Monozyten bei essentieller Hypertonie im Detail nicht erschöpfend geklärt.

Teilweise ist dies durch Schwierigkeiten der Monozyten-Isolierung bedingt. Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Verifizierung einer aktivierungsarmen Methode zur Monozyten-Isolierung und Inkubation und die Charakterisierung einer eventuellen Aktivierung durch entsprechend veränderte Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle.

In zahlreichen Arbeiten (Dörffel et al 2001, Clozel et al. 1991) werden aktivierte Monozyten bei Hypertonie postuliert. Es stellt sich die Frage, ob der erhöhte Aktivierungszustand zirkulierender Monozyten sich in einer spezifischen Änderung des Musters der Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle widerspiegelt.

Hypertonie ist einer der wesentlichsten Risikofaktoren in der Ätiologie von arteriosklerotischen Gefäßschäden (Violi et al. 1996). Der Mechanismus, der Hypertonie und die erhöhte Inzidenz der Arteriosklerose verbindet, wird jedoch noch nicht vollständig verstanden. Monozytenadhäsion scheint bei der Pathogenese der Arteriosklerose von zentraler Bedeutung zu sein. Da die Interaktion von Monozyten und Endothel abhängig von der Aktivierung einer Kaskade verschiedenster Adhäsionsmoleküle ist, würde der Nachweis von Adhäsionsmolekülveränderungen die Monozytenaktivierung belegen und gleichzeitig ein Bindeglied sein, um die Rolle von Hypertonie in der Pathogenese der Arteriosklerose besser zu verstehen.

Dörffel et al. 1999, 2001 belegt eine erhöhte Adhäsion von Monozyten bei essentieller Hypertonie und AT-Stimulation. Fu et al. 2000 entdeckte agonistische Autoantikörper gegen den Angiotensin II-Rezeptor Typ I (AT1-Rezeptor) im Serum von Patienten mit maligner essentieller Hypertonie. Zirkulierende AT1-Autoantikörper könnten auch für den Hochdruck bei Präeklampsie verantwortlich sein (Wallukat et al. 1999). Wir untersuchten, ob die Stimulation isolierter Monozyten mit AT und AT1-AK zu einem spezifisch veränderten Muster in der Adhäsionsmolekülexpression führt, welches eine erhöhte Monozytenadhäsion erklären könnte. LPS wird als typischer Monozytenstimulus beschrieben und ist eventuell in den Prozeß der

Arteriosklerose involviert. Vergleichend wird deshalb der Einfluß von LPS auf die Adhäsionsmolekül-Expression bestimmt.

Die weitere Charakterisierung der zellulären Immunologie von Monozyten bei Hypertonie und in der Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen sollte neue spezifische Ansatzpunkte für die Diagnostik und Therapie der Arteriosklerose eröffnen.

Dörffel et al. 1999 belegt eine verminderte Monozytenadhäsion an Endothel bei AT-Stimulation durch den AT1-Rezeptor-Antagonist Losartan. In der vorgelegten Arbeit wird untersucht, ob Losartan einen Einfluß auf durch AT bzw. AT1-AK induzierte Veränderungen der Oberflächenmoleküle hat.

Die Interaktion zwischen MAC-1 (CD11b/CD18) und dem Endothelliganden ICAM-1 (CD54) spielt eine Schlüsselrolle in der Adhäsion von Monozyten an das Endothel. Fraglich ist, ob der auch an MAC-1 bindenden Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor-Antikörper Abciximab eventuelle stimulationsbedingte Veränderungen der Adhäsionsmolekülexpression beeinflusst.

3. Methoden

3.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren Endotoxin frei. Endotoxin freies Fetales Kälber Serum (FCS) wurde von Biochrom KG/Seromed (Berlin) bereitgestellt. Die zur Monozytenisolierung verwendeten Dynabeads erhielten wir von Dynal, Fluoreszenz-konjugierte monoklonale anti-humane Maus-Antikörper lieferte Pharmingen (Beckton Dickinson), Abciximab (ReoPro) Lilly. Der AT1-Rezeptor Antagonist Losartan ist von Merk, den AT1-Autoantikörper stellte freundlicherweise Prof. Dr. G. Wallukat von der Franz Volhard Klinik des Max Delbrück Zentrums für Molekularmedizin in Berlin zur Verfügung. Angiotensin II und LPS sowie alle nicht anderweitig gekennzeichneten Chemikalien lieferte Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI, USA).

3.2. Einschlußkriterien der Studie

Gemessen wurden die Adhäsionsmoleküle von 29 Patienten (17 Männern und 12 Frauen) mit essentieller Hypertonie. Alle Patienten wurden in der Hypertonie Sprechstunde der medizinischen Poliklinik der Charité bzw. im St. Hedwigs Krankenhaus Berlin betreut. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission (Ethikkommission der Charité, EK-Votum vom 22.09.1999) zugelassen. Die Entnahme von Proben bei Routineblutentnahmen erfolgte freiwillig und nach Aufklärung.

Die Hypertonie-Gruppe setzt sich aus Patienten mit essentieller Hypertonie vor jeder medikamentösen Behandlung oder nach Unterbrechung der Behandlung für mindestens 72 h zusammen. Die Hypertonie wurde mittels kontinuierlicher 24 h Blutdruckmessung gesichert. Nur Patienten mit einem diastolischem Blutdruck zwischen 95 und 120 mmHg (mittlerer diastolischer Blutdruck 100 mmHg) und einem systolischem Blutdruck größer als 139 mmHg wurden in die Studie aufgenommen (Tab. 4).

	Hypertoniker Mittelwert (min-max)	Normalkontrollen Mittelwert (min-max)
Alter in Jahren	55 (41-72)	45 (32-68)
Systolischer Blutdruck / mmHg	161(140-200)	124 (107-140)
Diastolischer Blutdruck / mmHg	100 (95-120)	77 (60-90)
Body Mass Index / kg/m ²	24,1 (21,3-25,4)	23,9 (21,4-25,3)

Tabelle 4. Klinische Parameter von Hypertonie- und Normalkontroll-Kollektiv zum Zeitpunkt der Blutentnahme

Ausschlußkriterien waren alle infektiösen oder autoimmunen Krankheiten sowie die sekundäre Hypertonie. Patienten mit einer Vorgeschichte von Diabetes, Nikotinabusus, Schlaganfall, pAVK bzw. Angina pectoris wurden nicht in die Studie einbezogen. Bei abnormen Laborwerten für Hämatokrit, Leukozyten, Thrombozyten, Elektrolyte, C-reaktives Protein (CRP),

Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), Cholesterin bzw. LDL-Niveau, ALAT, ASAT, Kreatinin sowie Blutzucker wurde das Blut nicht verwendet (Tab. 5).

Parameter / Einheit	Normbereich	Hypertonie-Patienten Mittelwerte (min-max)
Cholesterin / mg/dl	<200	191 (148-198)
LDL / mg/dl	<180	128 (98-155)
Glukose / mg/dl	60-126	105 (67-125)
CRP / mg/dl	<1	0.3 (<0.1-0.6)
BSG / mm/h	6-11/6-20 (f), 3-8/5-18 (m)	9/18 (4-12/10-20)
Leukozyten / nl	3.1-9.5	4.9 (3,4-6,7)
Thrombozyten / nl	130-340	237 (181-330)
Hämatokrit / %	40-54	44 (37-51)
Kreatinin / mg/dl	<1.2	0,9 (0,7-1.0)
Na / mmol/l	135-145	141,5 (135-145)
K / mmol/l	3.6-4.8	4,0 (3,8-4,6)
ALAT/ U/l	<19	18 (13-19)
ASAT / U/l	<18	13,1 (8-16)

Tabelle 5 : Laborwerte und Normbereiche der Hypertonie-Patienten

Verglichen wurden die Adhäsionsmoleküle von 35 gesunden, freiwilligen Normalkontrollen (20 Männer, 15 Frauen) mit einem diastolischen Blutdruck zwischen 60 und 90 mmHg (Mittelwert 77 mmHg) und systolischen Blutdruckwerten zwischen 107 und 140 mmHg (Tab.3) bei zweimaliger Messung und ohne Anamnese von Hypertonie, Diabetes, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, pAVK, Angina pectoris, Schlaganfall und entzündlichen Erkrankungen sowie mit unauffälligem Blutbild. Patienten- und Kontrollgruppe wurden weitestgehend hinsichtlich Alter und Geschlecht gematcht. Bei Adhäsionsmolekülen, für die eine Korrelation mit dem Alter ermittelt werden konnte, wurde das Vergleichskollektiv exakt bezüglich des Alters angeglichen.

Eine Zusammenstellung der zum Vergleich Hypertoniker versus Normalkontrollen gewerteten Versuche gibt Tabelle 6.

Vers. Nr.	f/ m	Alter / J	RRsys / mmHg	RRdia / mmHg		Vers Nr.	f/m	Alter / J	RRsys / mmHg	RRdia / mmHg
Hypertoniker						Normalkontrollen				
14	m	41	160	100		15	f	43	136	75
18	f	58	200	95		16	m	51	127	72
19	f	69	165	100		17	f	58	110	90
23	m	61	140	95		20	f	53	111	88
24	m	50	150	110		21	f	58	140	90
25	f	63	170	100		27	m	51	120	75
26	m	43	140	100		28	m	36	140	78
31	f	46	160	100		29	m	41	108	71
32	m	46	140	95		30	f	40	107	86
33	f	54	150	100		36	m	47	134	81
34	m	56	170	120		37	m	32	140	60
35	f	52	160	100		38	f	45	107	74
58	m	72	160	95		39	f	45	115	69
59	f	60	150	95		41	m	47	113	74
60	m	51	140	100		50	m	68	130	80
61	f	57	160	100		51	f	50	130	70
85	m	56	170	105		52	f	39	121	73
86	m	65	175	100		53	f	42	131	90
						62	m	37	125	75
						63	m	36	120	80

Tabelle 6: Aufstellung der zum Vergleich Normalkontrollen-Hypertonie gewerteten Versuche mit Angabe von Versuchsnummer, Geschlecht (m/f), Alter, systolischem Blutdruck (RRsys), diastolischem Blutdruck (RRdia) bei Probenentnahme

3.3. Methoden der Monozytenisolierung

Venöse Blutproben von gesunden Normalkontrollen und hypertensiven Patienten wurden mit Heparin in physiologischer Kochsalzlösung antikoaguliert (30ml Vollblut zu 20ml 0.9% NaCl und 5000 IE Heparin (Dörffel et al. 1999)). Verschiedene Antikoagulantien (Citrat versus Heparin) bewirken lt. Mickelson et al. 1999 keinen Unterschied der CD11b-Expression. Monozyten wurden mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation über Ficoll und nachfolgender negativer Dynabead-Isolierung gewonnen. Verglichen wurde die Monozyten-Isolierung mittels Plastik-Adhäsion. Die unterschiedlichen Methoden wurden hinsichtlich Isolierungseffizienz (Reinheit), Vitalität und Einfluß auf Adhäsionsmoleküle evaluiert.

3.3.1. Dichte-Gradienten-Zentrifugation

Die Zentrifugation über Ficoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) ist eine schnelle, einfache und verlässliche Methode um mononukleäre Zellen aus Vollblut zu isolieren. Antikoaguliertes Blut wird sorgfältig über Ficoll geschichtet. Durch die niedrige Viskosität, die entsprechende Dichte und osmotischen Eigenschaften der Ficoll-Lösung führt Zentrifugation zur differenzierten Migration und zur Ausbildung von Schichten, die verschiedene Zelltypen enthalten (Abb.3).

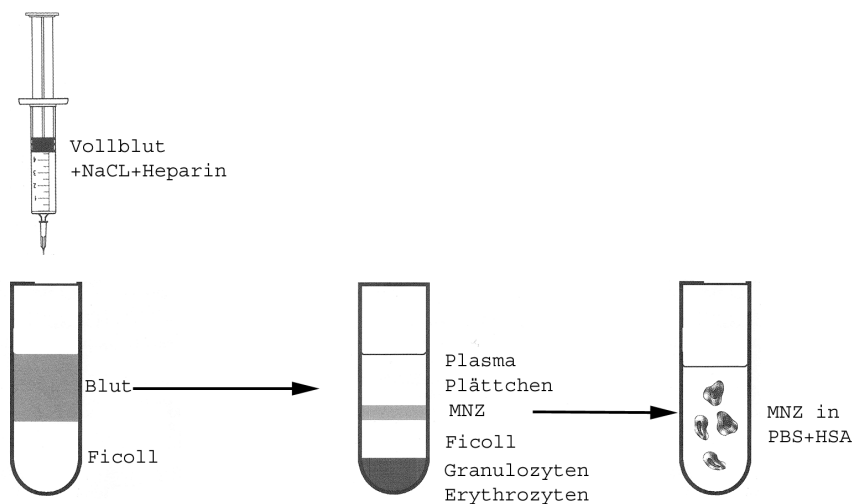


Abbildung 3 : Dichte-Gradienten-Zentrifugation zur Isolierung mononukleärer Zellen (MNZ)

Die unterste Schicht enthält Erythrozyten, die durch Ficoll aggregieren und deshalb komplett sedimentieren. Die Schicht unmittelbar über den Erythrozyten bilden vorwiegend Granulozyten, welche durch den osmotischen Druck der Ficoll-Lösung eine Dichte erhalten, die groß genug ist,

um durch die Ficoll-Schicht zu migrieren. Wegen ihrer geringen Dichte werden Lymphozyten und Monozyten mit den anderen langsam sedimentierenden Teilchen, wie z.B. Plättchen, an der Grenze zwischen Plasma und der Ficoll-Schicht gefunden.

Wir überschichten 15ml Ficoll mit 35 ml verdünntem, antikoaguliertem Blut in 50 ml PP-Falcon Tubes und zentrifugierten sofort bei 20°C. Zur Minimierung der Plättchenkontamination wurde statt einem einmaligem Zentrifugationsschritt über 40 min (Ficoll-Protokoll) ein erster Zentrifugationsschritt mit 160g für 20 min mit anschließendem Verwerfen des Überstandes und ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 350g für 20 min genutzt (Dyna-Bead Protokoll, Dörffel et al. 1999). Nach Verwerfen des Plasmas wurde die sorgfältig abpipettierte Schicht mononukleärer Zellen durch mehrfache Waschschritte in balancierter Salzlösung (PBS+ 0.1% HSA) von Plättchen, Ficoll-Resten und Plasma gereinigt.

3.3.2. Negativ-Isolierung mittels Dynabeads

Dynabeads (DynaL, Prod. 113.09) sind uniforme, superparamagnetische monodisperse, polymere Polystyren-Beads mit einem Durchmesser von 4.5 µm (Abb.4).

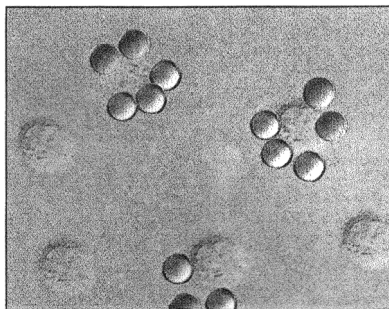


Abbildung 4: Von Dyna-Beads isolierte T Lymphozyten (aus Dynal Produktinformation)

Beads können zur Isolierung beliebiger Zellpopulationen mittels Negativ- bzw. Positiv-Isolierung verwendet werden. Bei der angewandten Negativ-Isolierung werden die Monozyten durch Entfernen der ungewünschten Natürlichen-Killer-Zellen (NK), T- und B-Lymphozyten aus einer mononukleären Zellsuspension gewonnen (Abb. 5). Ein Antikörpermix wird zur Zellsuspension gegeben und die Dynabeads binden an die antikörpergebundenen Zellen. Die Bead-umhüllten Zellen werden mittels eines Magneten (DynaL MPC) separiert und verworfen. Die isolierten Monozyten sind frei von Antikörpern und Beads und nicht durch Adhäsion aktiviert.

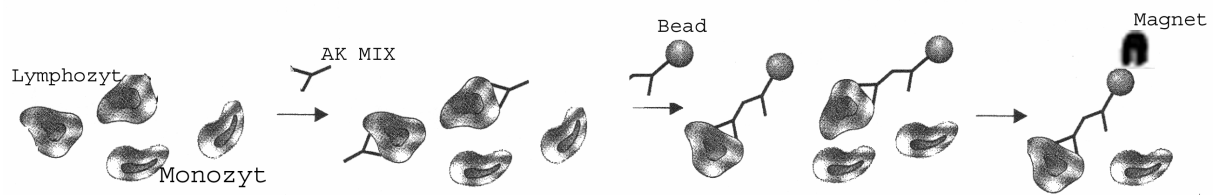


Abbildung 5: Negativisolierung von Monozyten

Das Monozyten-Isolierungs-Set von Dynal enthält Beads, Antikörper-Mix und Blocking-Reagenz. Die Dynabeads sind mit einem humanen IgG4 Antikörper gegen Maus IgG beschichtet. Der Antikörper-Mix besteht aus einer Mischung von monoklonalen Maus-Antikörpern gegen humanes CD2 (exprimiert von T-Lymphozyten), humanes CD7 (exprimiert von T-Lymphozyten, NK Zellen), humanes CD16 (auf NK Zellen), humanes CD19 (auf B-Lymphozyten) und humanes CD56 (auf NK-Zellen). Das Blocking-Reagenz enthält Gammaglobulin, um FcR auf Monozyten zu blocken. Die Isolierung erfolgte entsprechend dem Isolierungsprotokoll von Dynal.

3.3.3. Isolierung mittels Adhäsion an Plastik

Zum Vergleich der Isolierungsmethoden für Monozyten wurde die von Dörffel et al. 1999 u. a. beschriebene Isolierungsmethode mittels Adhäsion an Plastik ausgetestet. Dazu wurden die MNZ nach Dichte-Gradienten-Zentrifugation auf Polystyren-Petrischalen 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nicht adhärente Zellen wurden durch Waschen mit RPMI 1640 (37°C) entfernt. Durch Spülen mit kaltem RPMI 1640 (4°C) und vorsichtigem mechanischem Kratzen konnten 99% der adhärenen Zellen gewonnen werden. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und gefärbt.

3.3.4. Monozyten im Vollblut nach Erythrolyse

Zur Bestimmung des Einflusses der Isolierungsmethode erfolgten einige Messungen in erythrolysierten Vollblut. Für die Färbung wurden 200 µl Vollblut mit 1 ml Erythrolyse-Puffer versetzt und 10 min im Dunklen bei 4°C inkubiert (Vgl. Stent et al. 1997). Die gewaschenen Zellen wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt. Als Erythrolyse-Puffer wurde 0.01 M KHCO₃ + 0.155 M NH₄CL + 0.1 mM EDTA mit einem pH=7.5 von Syrbé/ Hamann (Deutsches Rheumazentrum) verwendet. Laut Arkin et al. 1991 verändern unterschiedliche Erythrolyse-Puffer in unterschiedlichem Maße die Expression von Oberflächenmarkern.

3.4. Monozyten-Stimulation

Das Verhalten verschiedenster Adhäsionsmoleküle auf Monozyten nach Einwirkung unterschiedlicher Stimulanzen wurde untersucht. Dazu wurden die mittels Negativ-Isolierung gewonnenen Monozyten in einer Konzentration von 1 Millionen Zellen pro 1ml in RPMI 1640 (mit 10% Fetalem Kälber Serum (FCS von Biochrom S0112 676S) und Glutamin 20mM/l) bei 37°C und 5 % CO₂ für 7 h inkubiert. Um adhäsionsvermittelte Aktivierung der Monozyten zu verhindern, erfolgte die Inkubation in offenen Polypropylen-Röhrchen. Zur Stimulation wurden LPS, AT oder AT1-AK verwendet. Entsprechend dem Versuchsablauf erfolgte 30 min vor Stimulationsbeginn eine Zugabe von Abciximab bzw. Losartan bei 37 °C. Die optimalen Stimulationsbedingungen wurden mittels Zeit- und Konzentrationskinetik ermittelt. Eine Stimulationszeit von 7h erwies sich in Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur für alle Stimulanzen als optimaler Stimulationszeitraum.

- Angiotensin II: Getestet wurden AT-Konzentrationen von 10⁻¹⁰ M bis 10⁻⁵ M. AT stimuliert Monozyten dosisabhängig ab einer Konzentration von 10⁻¹⁰ mol/l (physiologisch relevante Konzentration, Dörffel 2002, Hahn et al. 1994). Wir wählten für die Stimulationsversuche AT-Konzentrationen von 10⁻⁶ M mit optimaler Stimulation im Sättigungsbereich (Hahn et al. 1994). Die Aufbewahrung des stabilen Peptids erfolgte gefroren in einer Konzentration von 10⁻⁵ M.
- AT1-AK: Wir verwenden die IgG Fraktionen von Präeklampsie Patientinnen, deren Serum AT1-AA enthielt. Die Gewinnung der IgG Fraktion wird detailliert in Wallukat et al. 1999 beschrieben. Die Stimulation erfolgte mit gereinigtem AT1-AK in einer Konzentration von 1:100, mit ungereinigtem AT1-AK sind Konzentrationen von 1:40 notwendig. Konzentrationen von 1:1000 bis zu 1:20 wurden ausgetestet.
- Angiotensin-AT1-Rezeptor-Antagonist Losartan: Monozyten wurden 30 min vor AT bzw. AT1-AK Stimulation in 10⁻⁶ M Losartan inkubiert (entsprechend Wallukat et al. 1999). Ausgetestet wurden Konzentrationen von 10⁻⁸ M (lt. Dörffel et al. 1999), 10⁻⁵ M (lt. Kranzhöfer et al. 1999) und 10⁻³ M.

- LPS (E.coli Serotyp): Zeit- und Konzentrationskinetiken zeigten bereits nach 4 h eine Monozytenaktivierung bei LPS-Konzentrationen zwischen 10ng/ml und 1000 ng/ml (Dörffel et al. 1999). Getestet wurden LPS-Konzentrationen von 10 ng/ml, 100 ng/ml und 300 ng/ml. Zur Stimulation wurden LPS in einer optimalen Konzentration von 100 ng/ml verwendet.
- Abciximab (ReoPro): Der therapeutische Bereich von Abciximab liegt in vivo bei 5µg/ml (Neumann et al. 1999, Mick et al. 1999). Für in vitro Versuche wurden Konzentrationen zwischen 3.5µg/ml und 50µg/ml (Mickelson et al. 1999, Frederikson et al. 2000, Neumann et al. 1999) verwendet, wobei kein Unterschied zwischen Konzentrationen von 0.35 µg/ml bis 350 µg/ml feststellbar war (Mickelson et al. 1999). Übereinstimmend konnten wir in unseren Versuchen keine Veränderung der CD11a und CD11b-Expression bei Abciximab-Konzentrationen von 3.5µl/ml, 20µl/ml und 100µl/ml feststellen. Wir verwenden eine Inkubationskonzentration von 20 µg/ml Abciximab.

3.5. Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen mittels FACS

3.5.1. Meßprinzip

Für die Zytofluorometrie wurde ein FACS-Calibur verwendet. Das Durchflußzytometer FACScan von Becton Dickinson ermöglicht die zuverlässige Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften.

Die Zellsuspension aus dem Probenröhrchen wird mittels Überdruck der Meßküvette zugeführt. Die Zellen werden im Trägermedium (Sheat fluid: PBS) einzeln durch den Strahlengang eines Argon-Ionen-Lasers (Wellenlänge 488nm, Abb. 6) geführt. Die Interaktion von Laserstrahl und Zelle ist u.a. von der Größe, der Struktur von Zellmembran und Zellinnerem abhängig. Die Beugung des Lichtes in Richtung des einfallenden Strahles wird als Vorwärtslicht (forward light scatter, FSC) bezeichnet und ist abhängig von der Partikelgröße. Hinweis auf die Granularität der Zellen gibt das im rechten Winkel zum Strahleneingang gestreute Licht, das sogenannte Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC). Sowohl im FSC als auch im SSC wird jede Zelle von Detektoren mit je 1.024 Kanälen erfaßt.

Partikel mit hoher Eigenfluoreszenz oder nach Fluorochrom-Markierung werden von weiteren Detektoren mit hoher Sensitivität für bestimmte Wellenlängen gemessen. Dabei werden die fluoreszierenden Marker durch einen Laserstrahl bestimmter Wellenlänge angeregt und emittieren Lichtquanten mit einer für das jeweilige Fluorochrom spezifischen Wellenlänge. Die Fluoreszenzintensität ist ein relatives Maß für die Zahl der emittierten Signale und somit für die Anzahl der pro Zelle gebundenen Fluorochrom-Moleküle.

Das FASCcan erlaubt unter anderem die Erfassung von Grün- (FL 1, Wellenlänge 515-545 nm), von Orange- (FL 2, Wellenlänge 564- 606 nm) und von Rotfluoreszenzen (FL 3, Wellenlänge > 650 nm). Die Fluoreszenzaktivität wird logarithmisch verstärkt und auf einer linearen Skala mit 1.024 Kanälen, die 4 Log-Dekaden (0-10.000) entspricht, dargestellt. Wir messen somit gleichzeitig zwei morphologische Charakteristika und drei Fluoreszenzen.

Die Auswertung erfolgt mittels der zugehörigen Software (Cellquest) als Histogramm oder als „Dot Plot“. Beim „Dot Plot“ (Punktgraph) werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen und bei jeder Schnittstelle der beiden Werte ein Punkt angezeigt (korrelierte Zweiparameterdarstellung). Im Histogramm stellt die Abszisse die 1.024 Kanäle des jeweiligen Parameters dar und die Ordinate die Anzahl der jeweiligen Meßsignale in diesem Kanal. Mit Hilfe dieser

Darstellungen lassen sich die gemessenen Partikel empfindlich charakterisieren und gezielt untersuchen. Es ist möglich, durch „Gates“ nur Meßwerte aus definierten Teilbereichen zu erfassen.

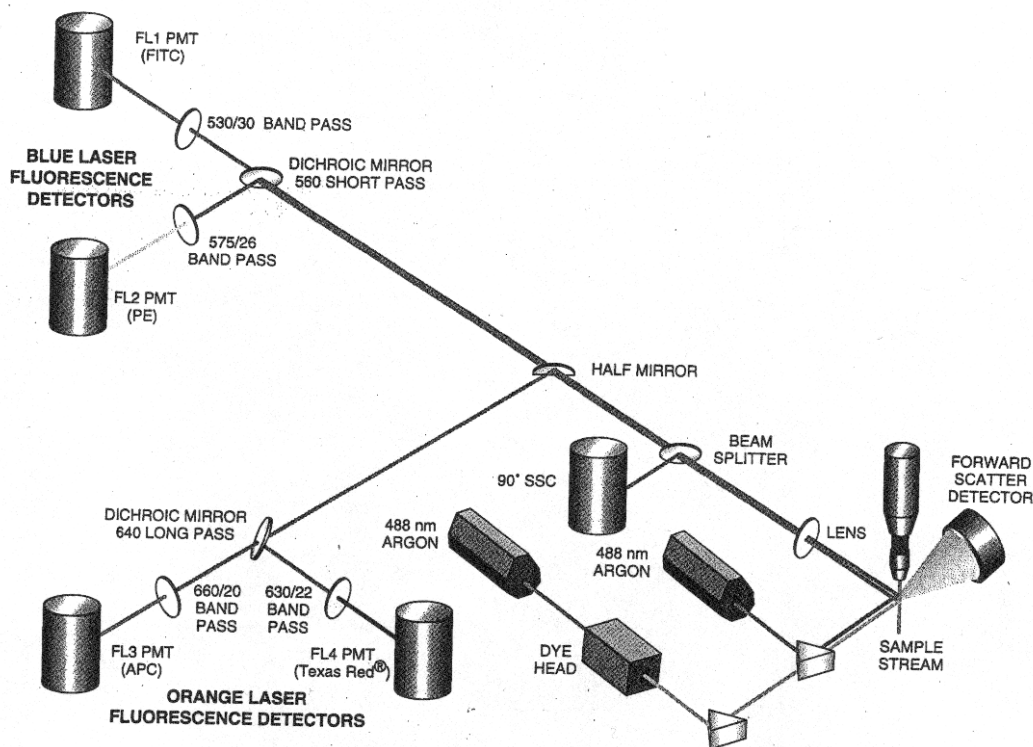


Abbildung 6: Aufbau eines dualen Durchflußzytometers mit sechs Detektionsparametern (aus Pharmingen Technical Protocols, S.887)

3.5.2. Direkte und indirekte Membranimmunfluoreszenz

Für die direkte Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet. Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird ein Primärantikörper, welcher an Oberflächestrukturen bindet, von einem sekundären, flouorochrom-gekoppelten Antikörper erkannt. Die Fluoreszenzintensität kann mit Hilfe des Durchflußzytometers gemessen werden und dient zum Nachweis bestimmter Oberflächestrukturen. Wir verwendeten industriell mit Fluorochromen gekoppelte primäre Antikörper (Abb.7), nur der Nachweis der Expression von 9eg7 erfolgte nach der Methode der indirekten Immunfluoreszenz.

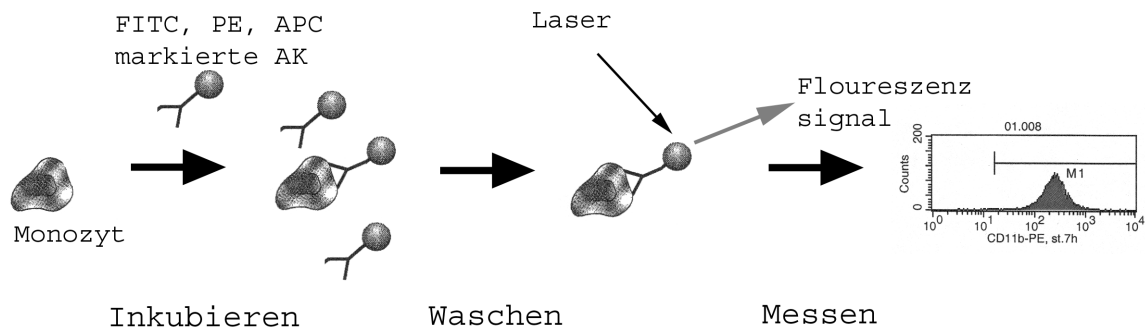


Abbildung 7: Färbung mit direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern zur FACS Auswertung

3.5.3. Messung der Adhäsionsmolekülexpression auf Monozyten

Für die Bestimmung der Adhäsionsmoleküle auf Monozyten wurden die mittels Negativ-Isolierung gewonnenen Monozyten gefärbt. Verwendet wurden Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte monoklonale Maus-IgG-Antikörper gegen die folgenden humanen Oberflächenmoleküle:

- Allophycocyanin (APC)-markierter Maus-Antikörper gegen den humanen Monozytenmarker CD14. CD14-Antikörper reagieren mit dem 53-55 Glykosylphosphatidylinositol Glykoprotein, daß von Monozyten stark exprimiert wird. CD14 ist ein Zelloberflächen-Rezeptor mit hoher Affinität für Lipopolisaccharide. CD14-Antikörper reagieren auch mit dendritischen Zellen, einigen Langerhanszellen und einigen Makrophagen.
- Fluoresceine isothiozyanat (FITC)-markierte Antikörper gegen CD11a, CD54, CD49d, CD29
- Phycoerythrine (PE)-markierte Antikörper gegen CD11b, CD31, CD44, CD62L
- Isotyp-Kontroll-Antikörper (PE-konjugierter monoklonaler Maus-IgG1, FITC-konjugierter monoklonaler Maus-IgG2)
- monoklonaler Antikörper (mAb) 9eg7 gegen $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6) auf Mausendothelzellen von Hamann (Lenter et al. 1993), Färbung der an Monozyten gebundenen 9eg7 Antikörper mittels FITC-konjugierter Sekundär-Anti-Maus-IgG-Antikörper

Es wurden je 1 Millionen Monozyten mit 20 μ l des jeweiligen Antikörpers (sättigende Konzentration) in einem Gesamtvolumen von 100 μ l PBS + 0.2% HSA für 20 min bei 4 °C

inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschr tte und die Fixierung in 300 l 1% Paraformaldehyd (PFA). Die Proben wurden bei 4 C dunkel gelagert und innerhalb von 48 h gemessen.

Die Monozyten wurden durch ein typisches Fluoreszenzmuster im FSC- und SSC-Bild von eventuell kontaminierenden anderen Leukozytensubpopulationen differenziert und ausgewertet (Mickelson et al. 1999) (Abb.8).

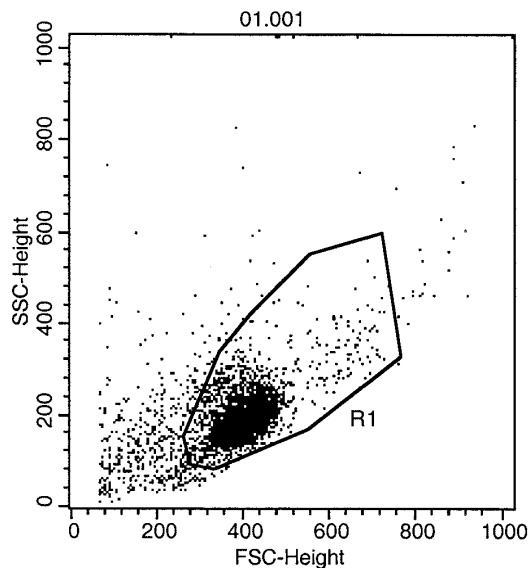


Abbildung 8: Monozytendifferenzierung im Dot-Plot FSC-SSC-Bild durch Wahl von R1

Durch Färbung mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern ist eine weitere Differenzierung von Monozyten (CD14), T-Lymphozyten (CD3) und B-Lymphozyten (CD19) möglich. Zur Optimierung des Monozyten-Gates wurde der Monozytenmarker CD14 verwendet. Nur CD14 positive Ereignisse im APC-Fluoreszenz-Histogramm wurden ausgewertet (Abb.9). Es wurden mindestens 10.000 Ereignisse gemessen.

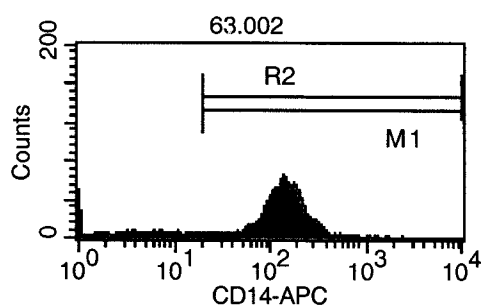


Abbildung 9: Monozytendifferenzierung im CD14-APC-Histogramm durch Wahl von R2

Die Expression der Adhäsionsmoleküle wurde durch PE- oder FITC-gekoppelte Antikörper bestimmt. Zur Feststellung unspezifischer Fluoreszenz wurden Kontroll-Antikörper des gleichen Isotyps verwendet. Anhand dieser wurde der Cut-off für die als positiv zu definierenden Zellen gesetzt. Die Isotyp-Fluoreszenz wurde bei nur mit ISO-Antikörpern gefärbten Kontrollproben pro Versuch über Verstärkungswahl zwischen 0 und 10 mit einem Mittelwert von 4 MFI eingestellt (Abb.10). Unter diesen Bedingungen sind <1% der gemessenen Zellen positiv in M1.

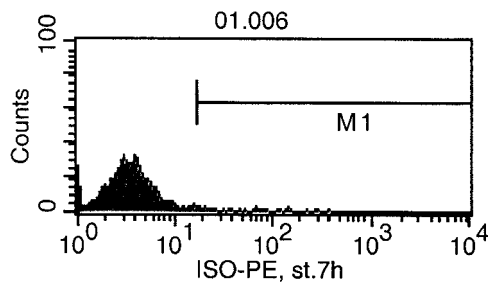


Abbildung 10: Abgrenzung unspezifisch gefärbter PE-Isotyp-Kontrollen durch Wahl von M1

Die mittlere Fluoreszenz Intensität ist ein Maß für die Antikörperbindung und somit für die Antigen-Oberflächenexpression (Neumann et al. 1999) (Abb.11).

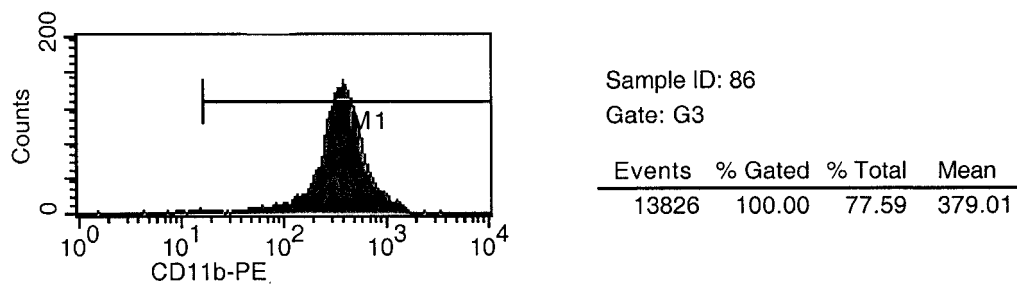


Abbildung 11: CD11b-PE Expression auf Monozyten (in G3=R1 und R2 und M1) im Histogramm, Auswertung des Mittelwertes (in MFI)

3.6. Vitalitätsbestimmung

3.6.1. Ausschlußfärbung mit Trypanblau

Die bei Nekrose auftretende frühe Zerstörung der Zytoplasmamembran kann man durch Ausschlußfärbungen nachweisen. Der Farbstoff Trypanblau dringt nur in sterbende oder abgestorbene Zellen ein, deren Zytoplasmamembran geschädigt ist. Zellen mit intakter Zytoplasmamembran werden nicht angefärbt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch. Nekrotische Zellen sind deutlich blau gefärbt, während lebende Zellen durchsichtig erscheinen.

3.6.2. Durchflußzytometrische Bestimmung der Vitalität

Geschädigte Zellen zeigen Veränderungen in Größe und Komplexität und sind im FSC-SSC Bild abzugrenzen. Außerdem lassen sich Membranintegritätsverluste durch Anwendung des Fluorochroms Propidiumjodid (PI, rotfluoreszierenden Farbstoff, 543 nm) nachweisen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff gelangt ebenfalls nach Schädigungen der Membranen in die Zelle und bindet spezifisch an Nukleinsäuren, hauptsächlich an die doppelsträngige genomische DNA, und dient so zur Beurteilung der morphologischen Integrität und damit der Vitalität der untersuchten Zelle. Die Analyse kann sowohl im Fluoreszenzmikroskop, als auch in einem Durchflußzytometer erfolgen. PI positive Zellen liefern Fluoreszenz-Signale in FL2 und FL3 und sind so von membranintakten Zellen abgrenzbar. Zur Methodenevaluation bei durchflußzytometrischen Messungen wurde PI mit einer Endkonzentration von 2 µg/ml zur Vitalitätsbestimmung eingesetzt.

3.7. Methode der mikroskopischen Immunfluoreszenz

Als alternativer Meßansatz wurde die Methode der Herstellung von Präparaten der mikroskopischen Immunfluoreszenz untersucht. Die Arbeit erfolgte mit Dr. Schulze und Prof. Dr. G. Wallukat des Max Delbrück Zentrums Berlin Buch. Erarbeitet wurden Möglichkeiten der Fixierbarkeit, des Transportes und Färbbarkeit der Monozyten. Da Temperaturschwankungen und Transportzeit die Expression der Adhäsionsmoleküle beeinflussen, ist eine unmittelbare Färbung und Fixierung zu bevorzugen. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind unbelichtet über mindestens 48 h stabil, aber instabil bei Belichtung. Eine quantitative Auswertung der Fluoreszenzstärke ist auf Grund der Flüchtigkeit der Fluoreszenz und der Schwierigkeit der Quantifizierung der Fluoreszenzstärke nicht möglich und in der Literatur unüblich. Fotografiert wurde mit unterschiedlichen Belichtungszeiten und im Phasenkontrastmodus (Abb.12).

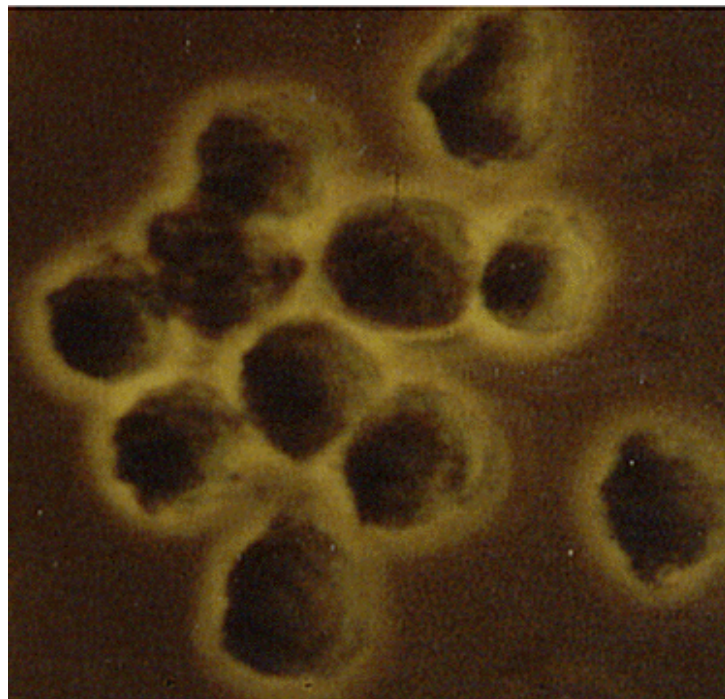


Abbildung 12: Isolierte Monozyten im Phasenkontrast-Mikroskop

FITC positive Granula bzw. Membranen leuchten grün (Abb.13). Mit Propidiumjodid (PI) sind gute Kernfärbungen möglich (Anregung wie FITC, Emission orange-rot) (Abb.14). Allerdings überdeckt die starke Fluoreszenz von PI geringere FITC-Fluoreszenzen der Zellmembran bei Doppelfärbung.

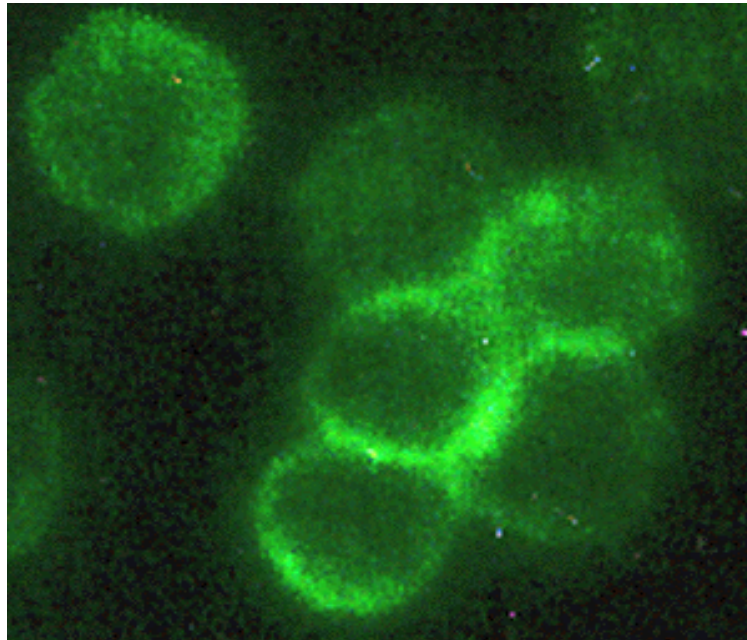


Abbildung 13: CD11a –FITC gefärbte Monozyten im Fluoreszenzmikroskop

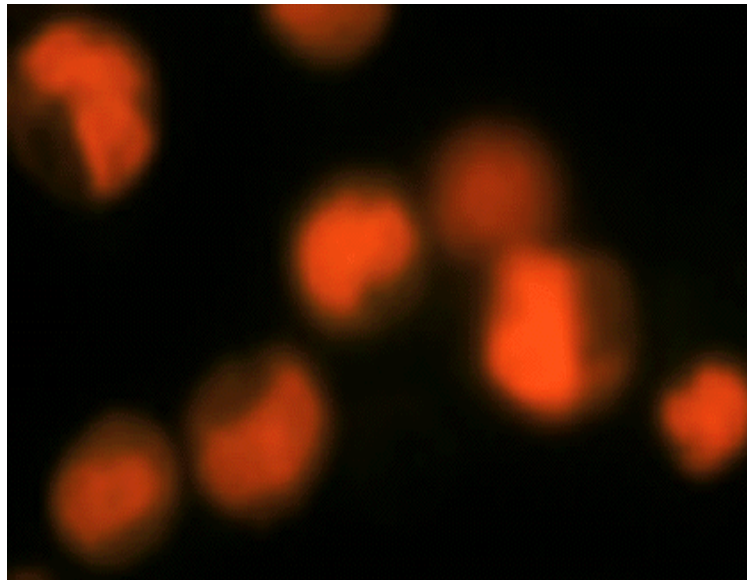


Abbildung 14: PI gefärbte Monozyten im Fluoreszenzmikroskop, Darstellung der Kerne

3.8. Datenanalyse

Die statistischen Auswertung wurde mittels SPSS 10.0 (Chicago) für Windows erstellt.

Als Maß der Fluoreszenzstärke (und somit als Maß für die Adhäsionsmolekülexpression) wurde der Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung verwendet. Die Angabe erfolgte als Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI). N bezeichnet die Anzahl der Experimente.

Häufigkeitsverteilungen dienten zur visuellen Veranschaulichung der Verteilungsunterschiede zwischen Hypertonikern und Normalkontrollen.

Um festzustellen, ob die Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle bei Hypertonikern signifikant unterschiedlich zu Normalkontrollen ist wurde der U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Der Test ist ein nichtparametrischer Test für unabhängige Stichproben und prüft Lageunterschiede zwischen Populationen (Wernicke et al. 1999). Bei $p < 0.05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit) werteten wir den Unterschied als signifikant.

Der Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen wie z.B. von Alter und Blutdruck zur Höhe der Oberflächenmarkerexpression wird statistisch repräsentativ im Pearson'schen Korrelationskoeffizienten ausgedrückt. Bei $p < 0.05$ ist die Korrelation signifikant.

Die Auswertung der Stimulationsversuche erfolgte mittels T-Test für gepaarte Stichproben (Mittelwertvergleich bei abhängigen Stichproben). Da ein Merkmal am selben Probandenblut beobachtet wird, handelt es sich um abhängige oder verbundene Stichproben. Die Nullhypothese („Der Erwartungswert, geschätzt durch den Mittelwert der Fluoreszenz, ist vor und nach Stimulation gleich“) wird bei zweiseitiger Fragestellung abgelehnt, wenn die dem berechneten t-Wert zugehörige Wahrscheinlichkeit p kleiner als die Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0.05$ ist. Sind die Testergebnisse in Form der Ablehnung der Nullhypothese signifikant, so sind die Unterschiede ebenfalls signifikant.

4. Ergebnisse

4.1. Methodenevaluation

Zur Methodenevaluation wurden zahlreiche Versuche zur Kontrolle der Reinheit und der Vitalität nach verschiedenen Isolierungs-Methoden bzw. -Schritten durchgeführt. Zum Vergleich des Einflusses der Isolierungsmethode wurde die Expression von Adhäsions-Molekülen auf Monozyten nach einzelnen Isolierungsschritten untersucht: die Zellen des Vollblutes nach Erythrolyse, die Zellen nach Dichte-Gradienten-Zentrifugation über Ficoll, die Zellen nach Dynabead Negativ-Isolierung bzw. Isolierung mittels Adhäsion an Plastik, unmittelbar nach Isolierung bzw. nach Färbung und nach Fixation.

4.1.1. Reinheit und Vitalität der Monozyten nach Isolierung

Nach Zentrifugation über Ficoll waren 95 % aller Zellen mononukleäre Zellen, ca. $50 \pm 10\%$ der Lymphozyten des Vollblutes blieben erhalten. Verunreinigend waren ca. 3 % Granulozyten und bis zu 5 % Erythrozyten. 15-50 % der MNZ waren in Abhängigkeit vom Spenderblut Monozyten. Nach Dynabead-Isolierung sank die Zellzahl durch Entfernung des Lymphozytenanteils. Aus 120 ml Blut erhielten wir durchschnittlich zwischen 10–30 Millionen Monozyten.

Reinheit: Zur Bestimmung von Verunreinigungen durch Lymphozyten wurden Kontrollfärbungen mit CD3-FITC für T-Lymphozyten und CD20-FITC bzw. CD19-PE für B-Lymphozyten durchgeführt. Die Reinheit nach Dynabead-Isolierung war größer als 90 %, wobei CD2, CD7, CD16, CD19 und CD56 positive Zellen zu mindestens 98 % entfernt waren. Der Anteil kontaminierender T-Lymphozyten lag bei 1% (CD3 Expression positiv) und B-Lymphozyten (CD19-Expression positiv) waren mit <1% vernachlässigbar.

Die Isolierungsreinheit wurde durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation über Lymphoprep statt Ficoll, nochmalige Dichte-Gradienten-Zentrifugation bzw. vollständige nochmalige Isolierung nach abgeschlossener erster Dynabead-Negativ-Isolierung oder Erythrolyse nach Dynabead-Isolierung nicht wesentlich verbessert.

Plastikadhärenz: Monozytenisolierung mittels Plastikadhärenz ergab einen erhöhten Anteil verunreinigender B- und T-Lymphozyten. Außerdem erfolgte eine Aktivierung der isolierten Monozyten über die Plastikadhärenz. Die dazu durchgeführten Versuche erfolgten noch ohne Iso-Antikörperfärbung und ermöglichen deshalb keine Quantifizierung des Einflusses auf die Expression der einzelnen Adhäsionsmoleküle.

Blut: Es bestand kein Unterschied in der Expression von Adhäsionsmolekülen zwischen aus Vollblut isolierten Monozyten und Monozyten aus frischen Buffy coats der Blutspendezentrale Ahrensfelde.

Vitalität: Zur Kontrolle der Toxizität der Isolierung erfolgte eine Färbung der Proben mit Trypanblau und in einigen Versuchen mit PI. Die Vitalität betrug ca. 98%. Über eine Auswahl des Gates erfolgte ausschließliche eine Messung der lebenden Zellen.

4.1.2. Monozyten im Vollblut

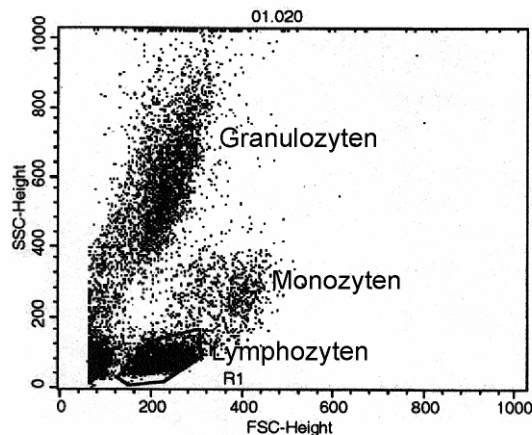


Abbildung 15: Zellen nach Erythrolyse im FACS als Dot-Plot

In Versuch Nr. 28 und Nr. 74 wurden die Monozyten und Lymphozyten im Vollblut nach Erythrolyse untersucht. Sie wurden als Vergleichspopulation betrachtet, da Monozyten nach Erythrolyse am wenigsten aktiviert sind. Abb.15 zeigt die Zellverteilung im FSC-SSC-Bild: Wegen ihrer höheren Komplexität unterscheiden sich Granulozyten im SSC von mononukleären Zellen und finden sich links oben. MNZ können wiederum durch ihre unterschiedliche Größe im FSC differenziert werden, da Lymphozyten (unten links) im Durchschnitt kleiner sind als Monozyten / Makrophagen (rechts darüber). In Abhängigkeit der Güte der Lyse ist ein unterschiedlich großer Anteil von verunreinigenden Erythrozyten unten links zu finden.

4.1.3. Monozyten nach Dichtegradientenzentrifugation

Während nach Erythrolyse der Monozyten-Anteil ca. 3 % aller Zellen betrug, waren nach Ficoll-Zentrifugation ca. 25 % der Zellen Monozyten und nach Bead-Isolierung > 90%. 98 % aller Zellen und 100 % der Monozyten waren vital. Die Bead-Isolierung reduzierte den B- und T- Lymphozyten-Anteil auf unter 1 %.

Die Expression der Adhäsionsmoleküle wurde durch die verschiedenen Isolierungsschritte beeinflusst. Nach Erythrolyse von Vollblut exprimierten Monozyten CD11a unverändert, CD11b niedriger, CD54 und CD62L gering erhöht und CD49d, CD29 stärker als nach Dyna-Bead-Isolierung. Nach Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation wurden im Vergleich zur Expression nach Isolierung CD11a unverändert, CD11b niedriger und alle anderen Marker erhöht exprimiert (Tab. 7).

Vers.28	CD 11a	CD 31	CD44	CD62L	CD11b	CD54	CD49	CD29
n.Lyse	47		115	9	154	69	115	395
n.Ficoll	48	95	173	7	240	102	80	267
isoliert	42	55	123	5	263	54	26	124
Versuch 29								
n. Ficoll	47	115	210		289	127	121	264
isoliert	42	84	181		434	83	35	157
Versuch 30								
n.Ficoll	60	103	293		195	125	110	393
isoliert	62	83	213		591	135	98	153

Tabelle 7: Expression der Adhäsionsmoleküle nach Erythrolyse, Ficollzentrifugation und Bead-Isolierung (angegeben als MFI) für Versuch 28, 29 und 30

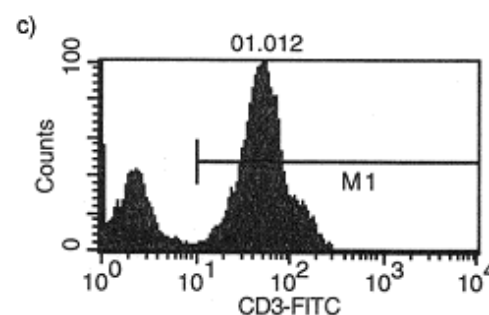
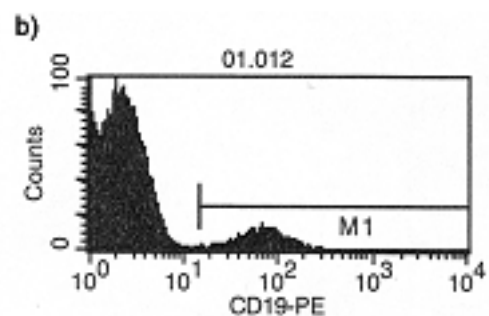
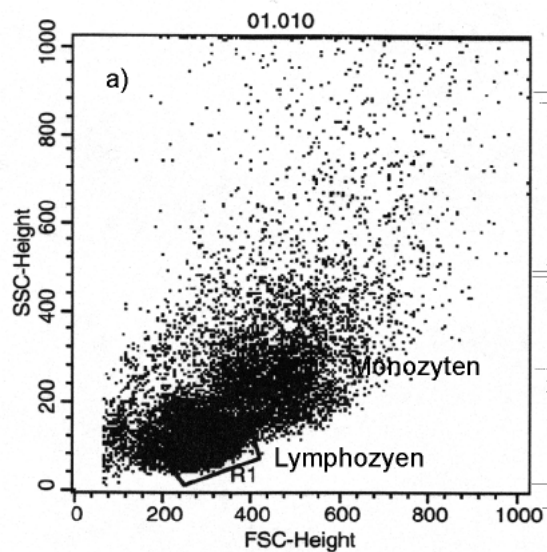


Abbildung 16: Zellen nach Ficoll-Zentrifugation
Dot-Plot und b) zugehöriges FACS-Histogramm
der CD19 positiven B- Lymphozyten sowie c)
der CD3 positiven T-Lymphozytenpopulation in R1

In Abb.16 ist ein FCS-SSC Bild nach Ficollzentrifugation dargestellt. Ein hoher Anteil von Lymphozyten (60-70%), eine Monozytenpopulation und einige Granulozyten und Erythrozyten waren meßbar. Die CD3-Expression kennzeichnet T-Lymphozyten und CD19 den B-Lymphozytenanteil.

4.1.4. Einflußfaktoren auf die FACS Messung

Kompensation: Zum Ausschluß von Artefakten, die aus überlappenden Fluoreszenzspektren resultieren, wurden die Detektorkanäle gegeneinander kompensiert. Die Kompensationsparameter wurden dann für alle Messungen beibehalten.

Inkubationsdauer der Fluorochrom-Antikörper: Die Inkubationsdauer hat nach einer Mindestzeit von 20 min keine wesentliche Änderung der Fluoreszenz zur Folge.

Konzentration der Fluorochrom-Antikörper: Zum Finden einer optimalen Färbekonzentration wurden die Fluoreszenz-Antikörper titriert. Eine Konzentration von 20 µl Antikörper/100 µl pro 1 Mio. Zellen wurde für die Versuche gewählt.

Fixierung: Fixierung vor Färbung erhöht die Fluoreszenz geringfügig, weshalb aus Gründen der Vergleichbarkeit immer vitale Zellen gefärbt und dann fixiert wurden. Die Fluoreszenzintensität von direkt nach Färbung fixierten Zellen entspricht der Fluoreszenzintensität von vitalen, unfixierten Zellen. Die Fluoreszenz bleibt bei 4°C in Dunkelheit mindestens 2 Tage stabil. Fluoreszenz-Messungen fixierter Zellen nach 9 h, 15 h und 36 h belegten die Unabhängigkeit aller Adhäsionsmoleküle vom Meßzeitpunkt.

Verstärkung: Um den Einfluß unspezifischer Bindungen zu beachten wurden als Kontrolle ungefärbte Proben und mit ISO-Antikörper gefärbte Proben mitgeführt. Die Meßeinstellungen erfolgten so, daß die Fluoreszenz der ISO-Antikörperfärbungen für Monozyten zwischen 0 und 10 MFI mit einem Mittelwert von 4 MFI lag.

Zur Fehleranalyse wurde versucht, den Einfluß der Verstärkung auf die Fluoreszenzleuchtstärke zu quantifizieren. Dazu wurden dieselben Proben mit verschiedenen Verstärkungen gemessen. Da sich kein eindeutiger Zusammenhang ergab, der eine einfache mathematische Korrektur der Ergebnisse ermöglichte, wurden die ohne ISO-Antikörper-Färbung gemessenen Versuche vom Vergleich bezüglich der unterschiedlichen Adhäsionsmolekül-Expression von Hypertonikern und Normalkontrollen ausgeschlossen.

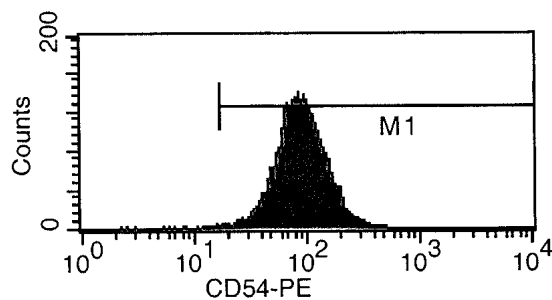
Eine Änderung des Fluoreszenz-Mittelwertes des ISO-Antikörpers um 1 MFI bewirkt eine Änderung von ca. 20 % um den Mittelwert des jeweiligen Adhäsionsmoleküls (Streuung von

$\pm 10\%$). Dieser zufällige Fehler wird durch möglichst exakte Einstellung der Verstärkung und bei großer Probenanzahl minimiert.

4.2. Adhäsionsmoleküle auf Monozyten bei Hypertonie

Im folgenden sind die Unterschiede der Adhäsionsmolekülexpression auf Monozyten von Hypertonikern und Normalprobanden dargestellt. Verglichen wurde die Expression direkt nach Dyna-Bead-Isolierung aus Blutproben von 18 Hypertonikern und 20 Normalkontrollen.

4.2.1 CD54



CD54 wird auf allen CD14 positiven Monozyten exprimiert (Abb. 18) und ist bei Bluthochdruck signifikant erhöht (Signifikanz 0.000).

Abbildung 18: CD54-PE Expression im FACS-Histogramm (in MFI)

Mittelwerte, Rang und Rangsumme im U-Test sind bei Hypertonikern höher als bei Normalkontrollen (Tab. 8). Auch die Häufigkeitsverteilung der CD54 Expression für Normalkontrollen und Hypertoniker ist deutlich verschieden (Abb. 19).

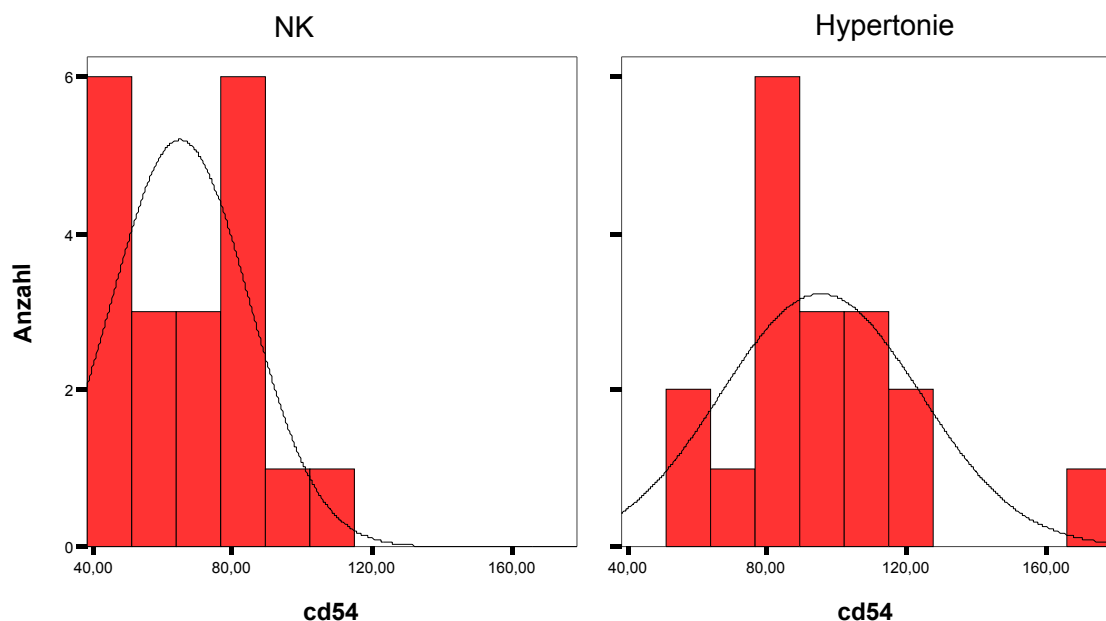


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung der CD54-Expression in MFI bei NK und Hypertonie

CD54 für	N	Mittlerer Rang	Rangsumme	Mittelwert	Standardabweichung
Hypertonie	18	25,97	467,50	95,44	28,56
NK	20	13,68	273,50	65,00	19,71

Tabelle 8: Rang (U-Test) und Mittelwerte der CD54 Expression bei Hypertonie im Vergleich zur Kontrolle (NK) (angegeben als MFI=Mittlere Fluoreszenz Intensität)

CD54 korreliert signifikant (Signifikanz 0.016) mit dem diastolischen Blutdruck, dagegen nicht mit dem systolischen Blutdruck und dem Alter (Abb. 20).

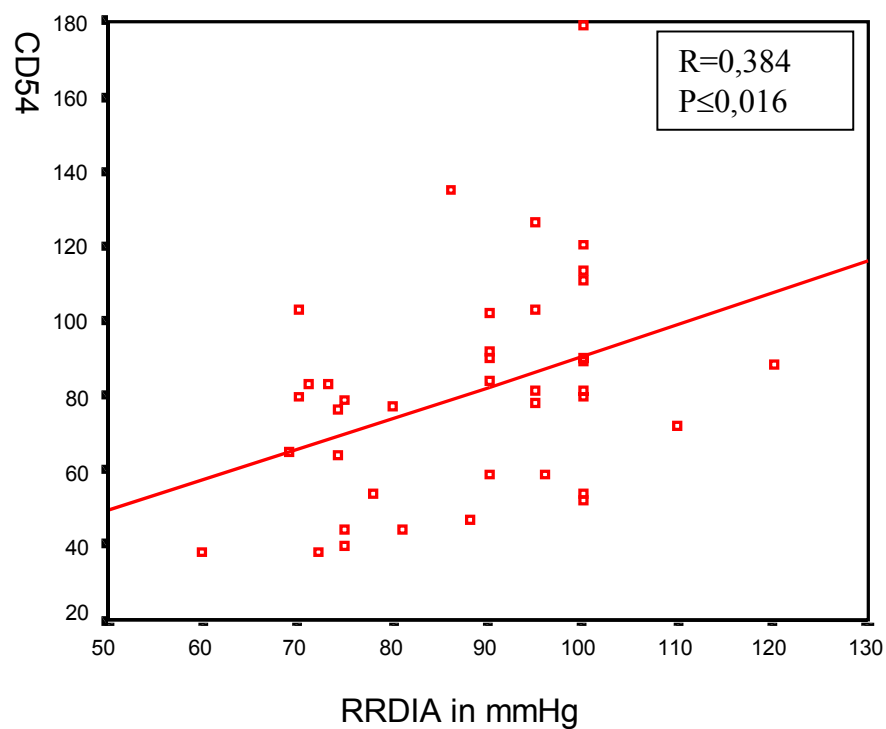


Abbildung 20: Korrelation von CD54 Expression (in MFI) und diastolischem Blutdruck

4.2.2. CD11b

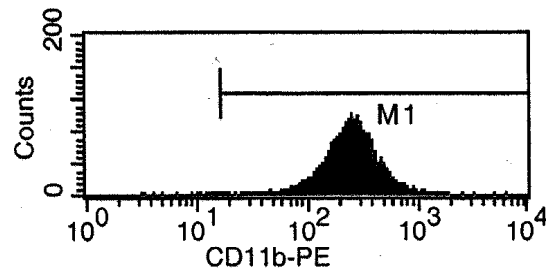


Abbildung 21: CD11b Expression (angegeben als MFI) im FACS-Histogramm

CD11b wird auf allen CD14 positiven Monozyten entsprechend Abb.21 exprimiert. CD11b ist bei Hypertonie signifikant erhöht (Signifikanz 0.001, Häufigkeitsverteilung siehe Abb.22).

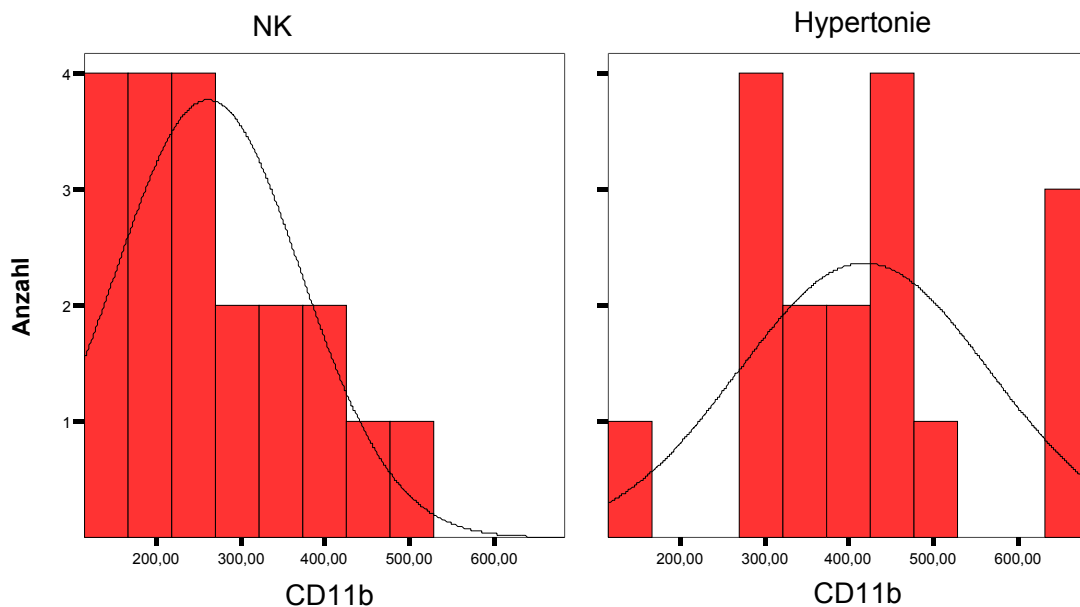


Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung der CD11b Expression (angegeben als MFI) bei Kontrollen (MW=417) und Hypertonikern (MW=275)

Zwischen diastolischem Blutdruck und CD11b-Expression besteht ein signifikanter Zusammenhang (Signifikanz 0,009, Abb. 23). Dagegen ist für Alter und systolischen Blutdruck keine statistisch signifikante Korrelation nachweisbar.

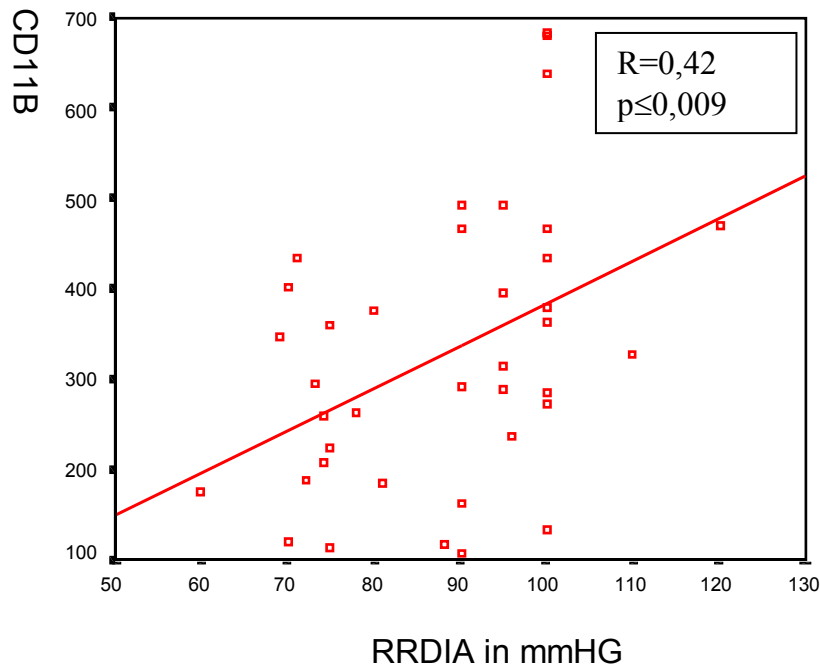


Abbildung 23: Korrelation von CD11b-Expression (als MFI) und diastolischem Blutdruck

4.2.3. CD11a

CD11a wird von allen Monozyten exprimiert. Die Expression ist bei Hypertonie signifikant erhöht (Signifikanz 0.002). Häufigkeitsverteilungen (Abb.24) und Mittelwerte sind bei Hypertonikern (MW=47 MFI) und Normalkontrollen (MW=34 MFI) signifikant unterschiedlich.

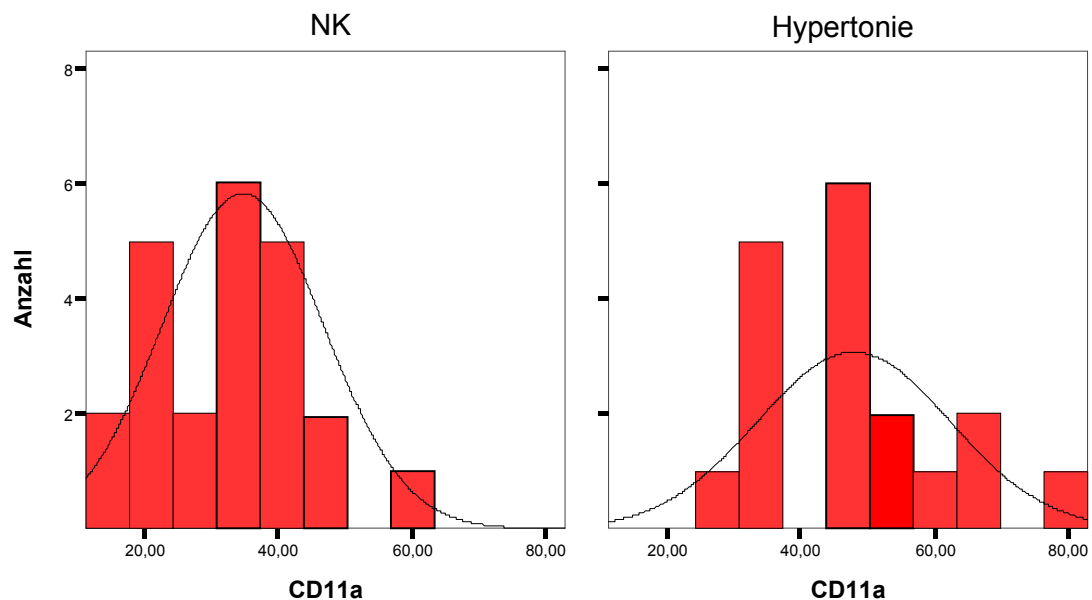


Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung der Expressionshöhe von CD11a für NK und Hypertonie

Mit dem diastolischen Blutdruck (Signifikanz 0,016, Abb.25) und dem Alter (Signifikanz 0,026, Abb.26) ist die CD11a Expression signifikant korreliert. Auch nach Altersanpassung durch Paarbildung ergibt sich ein signifikanter Unterschied (Signifikanz 0.005) der CD11a-Expression bei Hypertonie.

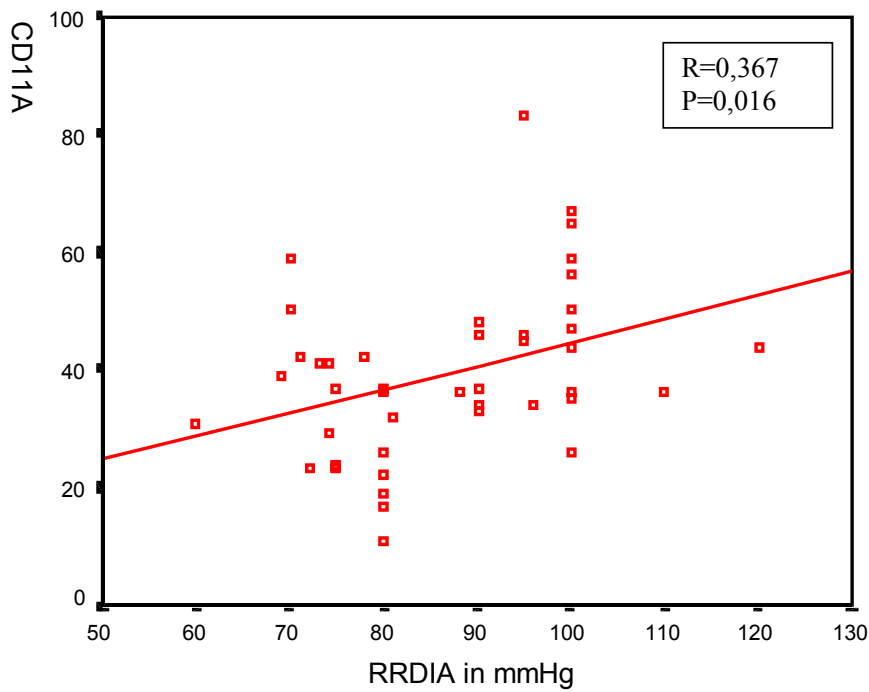


Abbildung 25: Korrelation von CD11a-Expression (als MFI) und diastolischem Blutdruck

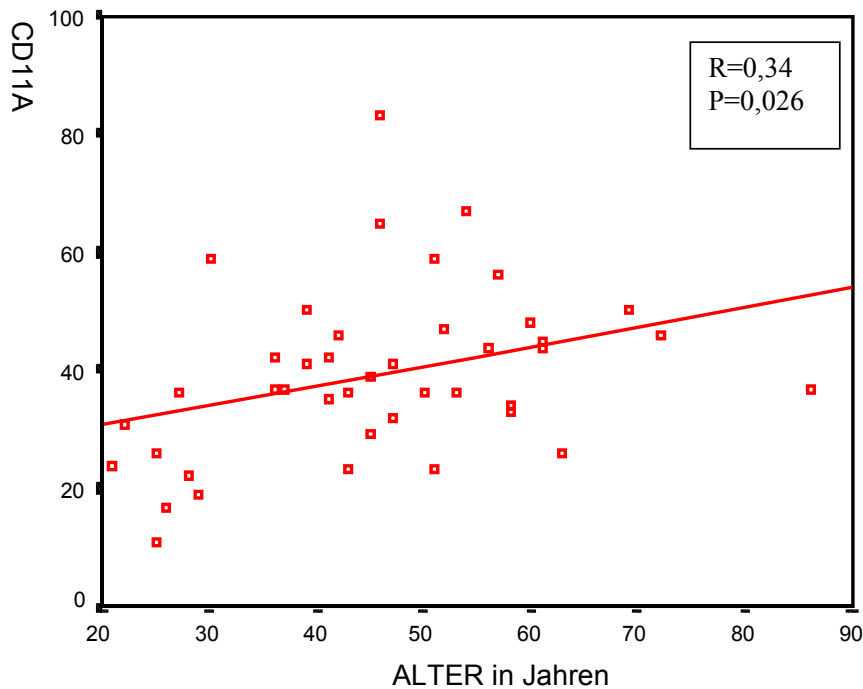


Abbildung 26: Korrelation von CD11a-Expression (als MFI) und Alter

4.2.4. CD29

CD29 wird auf allen Monozyten exprimiert (Abb.27). Es gibt gravierende individuelle Unterschiede in der Expression, die sich in einer großen Standardabweichung äußern. Es ist kein Expressions-Unterschied bei Hypertonie nachweisbar (Signifikanz 0,959, Abb.28).

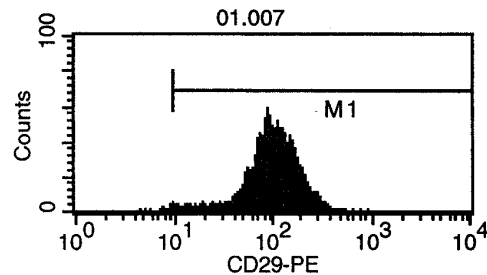


Abbildung 27: Expression von CD29 (als MFI) auf Monozyten im FACS Histogramm

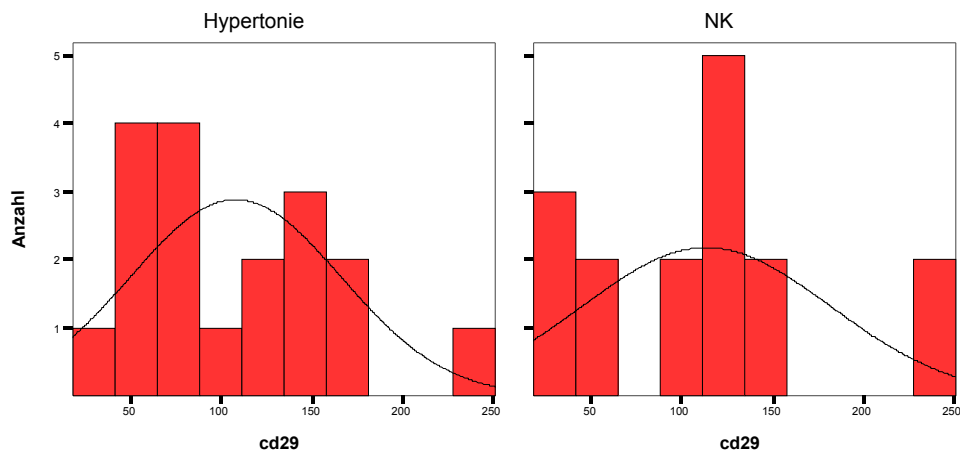


Abbildung 28: Häufigkeitsverteilung der CD29-Expression (als MFI) bei Hypertonie und NK

4.2.5. CD31

CD31 wird, wie in Abb.29 beispielhaft dargestellt, auf allen Monozyten exprimiert. Es besteht kein Unterschied in der Expression zwischen Kontrollgruppe und Hypertonikern (MW= 60 MFI, Signifikanz 0.945).

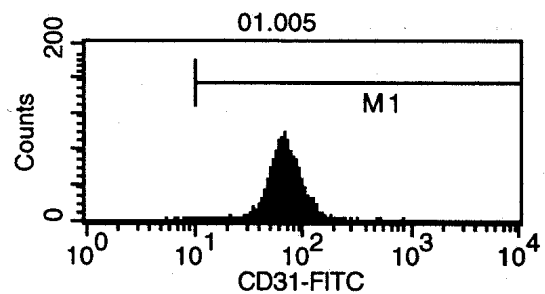
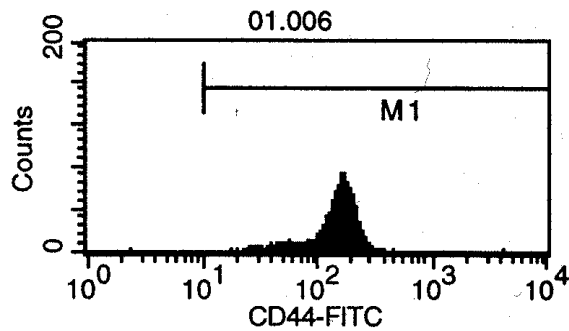


Abbildung 29: FACS Histogramm CD31(als MFI)

4.2.6. CD44



Alle Monozyten exprimieren CD44 entsprechend Abb.30. Die Expression ist alters- und blutdruckunabhängig (MW=125 MFI, Signifikanz 0.5).

Abbildung 30: CD44-Expression im FACS Histogramm

4.2.7. CD49d

Auch CD49d wird von allen Monozyten exprimiert (Abb.31). Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen der CD49d Expression von Hypertonikern (MW= 74 ± 34 MFI) und Normalkontrollen (MW= 59 ± 32 MFI) festzustellen (Signifikanz 0.21, Abb.32).

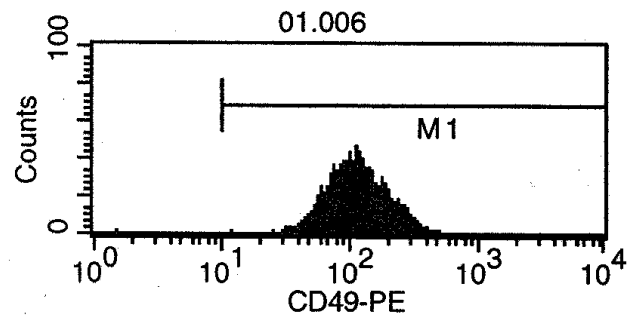


Abbildung 31: FACS Histogramm CD49-PE

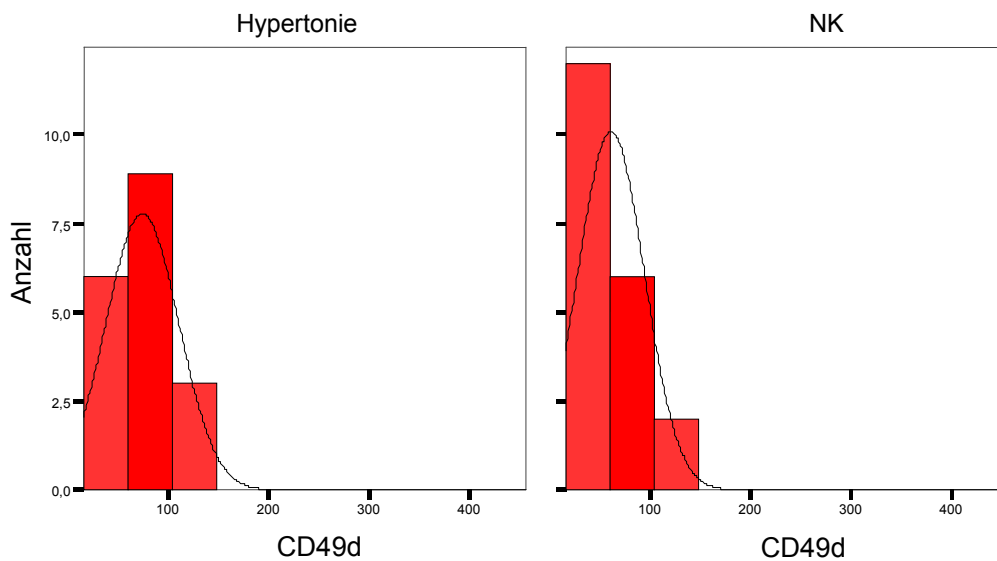
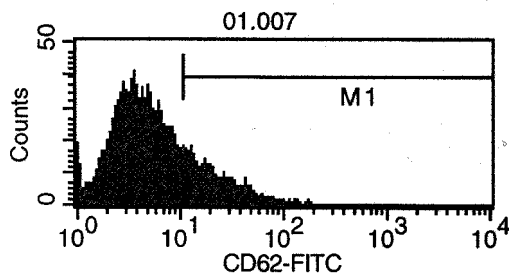


Abbildung 32: Häufigkeitsverteilung der CD49d-Expression in MFI bei Hypertonie und NK

4.2.8. CD62L



Isolierte Monozyten exprimieren CD62L gering. Die Expressionshöhe ist zwischen 0 und 100 MFI mit Mittelwerte um 12 MFI verteilt (Abb.33). Es besteht kein nachweisbarer Unterschied der Expression in Abhängigkeit vom Blutdruck.

Abbildung 33: FACS Histogramm CD62L

4.2.9. 9eg7

Lenter et al. 1993 und Hamann entwickelten einen monoklonalen Antikörper 9eg7 gegen Mausendothelzellen, der die Adhäsion von Lymphozyten an das Endothel blockt. Dieser Antikörper erkennt $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6), und definiert somit ein Epitop der $\beta 1$ -Integinkette, welches nur nach Aktivierung des $\alpha 4\beta 1$ Heterodimer z.B. durch Mn^{2+} zugänglich ist (Lenter et al. 1993). $\alpha 6\beta 1$ wird konstitutiv auf Endothelzellen exprimiert und ist wahrscheinlich in die späte Phase der Adhäsion von Lymphozyten integriert. Wir testeten, ob der von Hamann isolierten Antikörper auch an humane Monozyten bindet.

Mittels Färbung der an Monozyten gebundenen 9eg7 Antikörper mittels FITC-konjugierter Sekundär-Anti-Maus-IgG-Antikörper ist eine geringfügige Fluoreszenzerhöhung gegenüber der Negativkontrolle belegbar. $\alpha 6\beta 1$ scheint somit auch auf menschlichen Monozyten schwach exprimiert zu werden. Allerdings erlaubte die nur geringfügige Fluoreszenzerhöhung gegenüber der Negativkontrolle auch bei verschiedenen Antikörperkonzentrationen keine detaillierte Beurteilung eventueller Expressionsveränderungen durch Hypertonie oder Stimulierung.

4.3. Einfluß von Stimulation auf die Expression von Monozytenadhäsionsmolekülen

Um die Adhäsionsmolekül-Veränderungen isolierter Monozyten bei LPS, AT und AT1-AK Stimulation zu untersuchen, wurde die Expression auf in Puffer inkubierten Monozyten mit der Expression auf mit Stimulanzen inkubierten Monozyten verglichen. Die Stimulationsversuche erfolgten überwiegend bei Normalprobanden. Bei beobachteter Empfindlichkeit wurde die Stimulierbarkeit der Monozyten von Hypertonikern verglichen. Zur statistischen Auswertung wurde der T-Test für gepaarte Stichproben verwendet.

Auf die Angabe der Daten für durch Stimulation unveränderte Adhäsionsmoleküle wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. CD11a ist sehr stabil in seiner Expression. Es verändert sich weder durch Inkubation noch durch die verschiedensten Stimulanzen (AT, AT1-Antikörper, LPS, TNF sowie Losartan). AT und AT1-Antikörper haben auch in höheren Konzentrationen keine nachweisbare Wirkung auf die Expression von CD31 und CD44. AT verändert die Expression von CD49d nicht. CD29 verhält sich sehr labil. Es ist unabhängig von der Höhe der Ausgangsexpression, dem Blutdruck oder von der Inkubationsdauer, ob ein Anstieg oder ein Abfall der CD29 Expression zu verzeichnen ist. CD62L wird nach Isolierung und Inkubation so niedrig exprimiert, dass der statistisch signifikante Nachweis einer weiteren Expressionserniedrigung durch Stimulation mit Angiotensin II, AT1-Antikörper und LPS nicht möglich ist. LPS führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der CD44 und CD49d Expression.

4.3.1. Veränderungen durch Inkubation

Die Inkubation in Suspension bewirkt bereits spezifische Veränderungen der untersuchten Adhäsionsmoleküle auf Monozyten. CD54 steigt signifikant bei Inkubation (Tab. 9).

Versuche zum Einfluß von	N	CD54 bei	Mittelwert	Standard-abweichung	MW -Diff.	Sig. (2-seitig)
Zeit	18	T0	88,00	32,05	-195,67	,000
	18	T1	283,67	196,03		

Tabelle 9: T-Test für CD54 bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD54 (angegeben als MFI) direkt nach Isolierung (T0) mit der Expression nach Inkubation für 7h (T1) verglichen.

CD11b sinkt signifikant bei Inkubation (Tab.10).

Versuche zum Einfluß von	N	CD11B für	Mittelwert	Standardab- weichung	MW-Diff.	Sig. (2seitig)
Zeit	13	T0	334,54	141,80	102,00	,000
	13	T1	232,54	129,60		

Tabelle 10: T-Test für CD11b bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD11b (in MFI) direkt nach Isolierung (T0) mit der Expression nach Inkubation für 7h (T1) verglichen.

Inkubation erniedrigt CD31 signifikant (Tab.11).

Vers. zum Einfluß von	N	CD31 für	Mittelwert	Standard- abweichung	MW-Diff.	Sig. (2seitig)
Zeit	20	T0	61,65	17,82	11,40	,006
	20	T1	50,25	21,32		

Tabelle 11: T-Test für CD31 bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD31 (als MFI) direkt nach Isolierung (T0) mit der Expression nach Inkubation (T1) verglichen.

CD44 steigt signifikant mit der Inkubation (Tab.12).

Vers. zum Einfluß von	N	CD44 für	Mittelwert	Standard- abweichung	MW-Diff.	Sig. (2seitig)
Zeit	20	T0	128,85	49,97	-78,55	,014
	20	T1	207,40	152,70		

Tabelle 12: T-Test für CD44 bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD44 (als MFI) direkt nach Isolierung (T0) mit der Expression nach Inkubation (T1) verglichen.

CD11a verändert sich durch Inkubation nicht. Die CD49d- und CD62L-Expression sinken durch die Inkubation, eine Signifikanz ist auf Grund geringer Versuchsanzahl nicht belegbar. CD29 verhält sich sehr labil. Inkubation bewirkt in 12 Versuchen einen Anstieg und in 12 weiteren Versuchen ein Abfall der CD29 Expression.

4.3.2. Stimulation mit LPS

4.3.2.1. Adhäsionsmolekül-Veränderungen durch LPS

LPS-Stimulation erhöht die CD54-Expression signifikant (Tab.13). Dabei ist die Stimulierbarkeit durch LPS sowohl für Hypertoniker als auch Normalkontrollen gegeben und bei Konzentrationen von 10 ng/ml als auch von 100 ng/ml zu beobachten. Nach 7 h weisen die meisten Probanden eine Expressionserhöhung von CD54 durch LPS auf (6 von 12 Normalkontrollen und 4 von 5 Hypertonikern). Die Sensibilität bezüglich LPS-Stimulation ist eventuell bei Hypertonie erhöht.

Versuche zum Einfluß von	N	CD54 bei	Mittelwert	Standard- abweichung	MW -Diff.	Sig. (2-seitig)
LPS	17	T1	280,71	180,88	-62,18	,020
	17	LPS	342,88	207,25		

Tabelle 13: T-Test für CD54 bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD54 (als MFI) nach Inkubation (T1) und nach Stimulation mit LPS verglichen.

LPS-Stimulation erhöht auch die CD11b Expression signifikant (Tab.14). Die Expressionserhöhung ist nach Stimulation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml bereits nach 7 h deutlich. LPS bewirkt eine CD11b-Erhöhung bei allen Hypertonikern und 5 von 7 Normalkontrollen.

Versuche zum Einfluß von	N	CD11B für	Mittelwert	Standardab- weichung	MW-Diff.	Sig. (2seitig)
LPS	12	T1	291,75	180,70	-59,33	,041
	12	LPS	351,08	231,03		

Tabelle 14: T-Test für CD11b bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD11b (als MFI) nach Inkubation (T1) und nach LPS-Stimulation verglichen.

LPS bewirkt eine geringfügig erniedrigte Expression von CD31 (Tab. 15).

Vers. zum Einfluß von	N	CD31 für	Mittelwert	Standard- abweichung	MW-Diff.	Sig. (2seitig)
LPS	16	T1	47,06	22,51	5,63	,041
	16	LPS	41,44	22,26		

Tabelle 15: T-Test für CD31 bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD31 (als MFI) nach Inkubation (T1) und nach LPS-Stimulation verglichen.

4.3.2.2. Einfluß von Abciximab auf LPS stimulierte Monozyten

Vorinkubation mit Abciximab (ReoPro) führt bei LPS stimulierten Monozyten zu einer leicht erhöhten CD54 Expression. Während Inkubation mit Abciximab (ReoPro) bei unstimulierten Zellen die CD11b Expression erhöht (Abb.35), wird der durch LPS Stimulation bedingte Anstieg der CD11b Expression durch Abciximab deutlich vermindert (Abb.34).

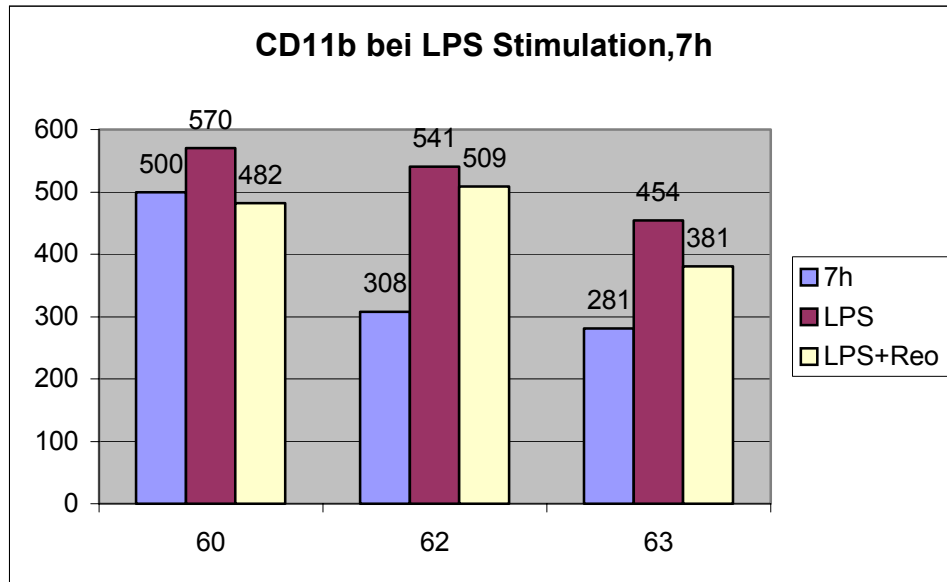


Abbildung 34: Wirkung von Abciximab (Reo) auf LPS stimulierte CD11b Expression (angegeben als MFI) in den Versuchen 60, 62, 63. Expression nach 7h Inkubation, nach LPS Stimulation (100ng/ml) und nach Inkubation mit ReoPro und LPS.

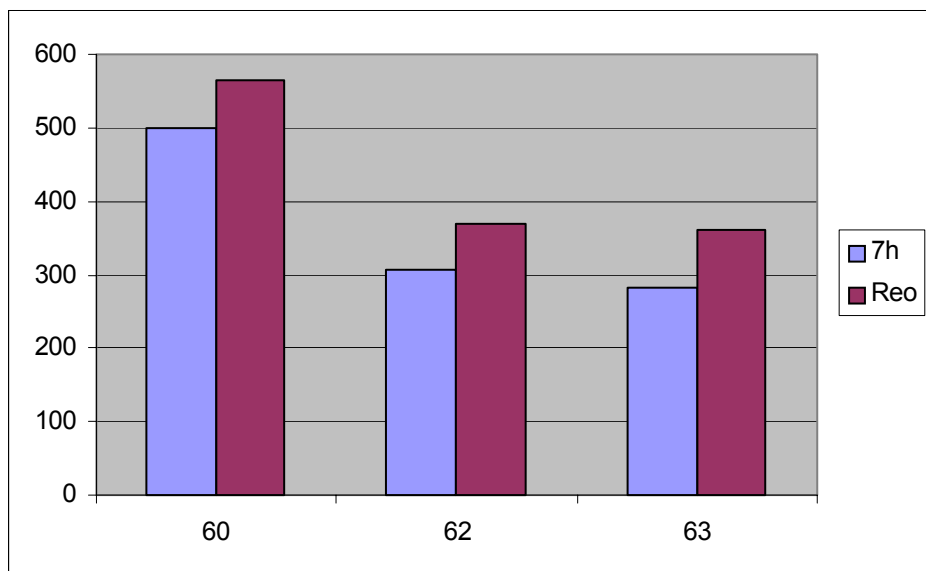


Abbildung 35: Abciximab erhöht die unstimulierte CD11b Expression (angegeben als MFI) in den Versuchen 60, 62, 63. Vergleich der Expression nach 7h Inkubation mit und ohne Abciximab (Reo).

4.3.3. Stimulation mit Angiotensin II und AT1-AK

4.3.3.1. Adhäsionsmolekül-Veränderungen durch Angiotensin II

Der Vergleich von ohne und mit AT inkubierten Monozyten zeigt einen signifikanten Expressionsanstieg von CD11b durch AT (Tab.16).

Versuche zum Einfluß von	N	CD11B für	Mittelwert	Standardabweichung	MW-Diff.	Sig. (2seitig)
AT	7	T1	233,71	99,55	-47,00	,036
	7	AT	280,71	114,69		

Tabelle 16: T-Test für CD11b bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD11b (als MFI) nach Inkubation für 7h (T1) mit der Expression nach Stimulation mit AT verglichen.

AT Stimulation bewirkt ein geringfügiges Absinken der Expression von CD54 ohne statistische Signifikanz. Dabei ist die vermutliche Wirkung von AT anscheinend erst bei hohen Konzentrationen und längerer Inkubationsdauer ausgeprägt. So reagieren bei einer AT-Konzentration von 10^{-6} M nach 14 h alle untersuchten Probanden (3 Versuche, Normalkontrollen) mit einer geringen Expressionserniedrigung, während bei Konzentrationen von 10^{-8} M in 3 Versuchen (Normalkontrollen) keine Änderung zu beobachten ist. Bei AT-Konzentrationen von 10^{-6} M reagieren nach 7 h Inkubation 4 von 5 Hypertonikern mit leichter Expressionserniedrigung, während Normalkontrollen noch keine Empfindlichkeit aufweisen.

4.3.3.1. Adhäsionsmolekül-Veränderungen durch AT1-Rezeptor Antikörper

23 Versuche belegen einen statistisch hoch signifikanten Anstieg von CD11b nach Inkubation mit AT1-Antikörper (Tab.17).

Versuche zum Einfluß von	N	CD11B für	Mittelwert	Standardabweichung	MW-Diff.	Sig. (2seitig)
AT1-AK	23	T1	162,96	118,13	-177,04	,000
	23	AT1-AK	340,00	104,53		

Tabelle 17: T-Test für CD11b bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD11b (als MFI) nach Inkubation für 7h (T1) mit der Expression nach Stimulation mit AT1-AK verglichen.

Die CD54 Expression steigt signifikant durch AT1-Antikörper Stimulation (Tab.18). Bei höheren Antikörperkonzentrationen reagieren sowohl Hypertoniker als auch Normalkontrollen mit einer deutlichen Expressionserhöhung (4 Versuche, davon 2 Hypertoniker, 2 Normalkontrollen). Bei niedrigen Antikörperkonzentrationen gibt es Unterschiede in der individuellen Empfindlichkeit, nur zwei von 5 Hypertonikern und drei von 10 Normalkontrollen reagieren mit leichter Expressionserhöhung.

Versuche zum Einfluß von	N	CD54 bei	Mittelwert	Standard-abweichung	MW -Diff.	Sig. (2-seitig)
AT1-AK	15	T1	263,20	177,02	-64,73	,034
	15	AT1AK	327,93	197,27		
hohe AT1-AK Konzentration	4	T1	261,50	202,03	-166,25	,076
	4	AT1-AK hoch	427,75	196,51		

Tabelle 18: T-Test für CD54 bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD54 (angegeben als MFI) nach Inkubation für 7h (T1) mit der Expression nach Stimulation mit AT1-AK und AT1-AK in doppelter Konzentration (1:50) verglichen.

AT1-Antikörper-Stimulation bewirkt eine signifikante Erhöhung der CD49d Expression geringer Amplitude (Tab. 19). Die Expressionserhöhung ist bei höherer Antikörperkonzentration nicht deutlicher.

Vers. zum Einfluß von	N	CD49d für	Mittelwert	Standard-abweichung	MW-Diff.	Sig. (2seitig)
AT1-AK	11	T1	29,82	18,15	-3,64	,030
	11	AT1-AK	33,45	18,23		

Tabelle 19: T-Test für CD49d bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD49d (als MFI) nach Inkubation für 7h (T1) mit der Expression nach Stimulation mit AT1-AK verglichen.

4.3.3.3. Einfluß von Losartan auf AT bzw. AT1-AK stimulierte Monozyten

Der AT1-Rezeptorantagonist Losartan verringert die Stimulierbarkeit von CD11b durch AT als auch durch AT1-Antikörper. Durch Inkubation mit Losartan sind die Mittelwerte der CD11b Expression AT bzw. AT1-AK stimulierter Monozyten tendenziell erniedrigt (Tab.20). Die Versuchszahl ist zu gering und die AT1-Antikörper-Konzentration in den durchgeführten Versuchen zu niedrig, um die CD11b Expression signifikant zu erhöhen. Somit ist keine statistisch relevante Aussage zur Wirkung von Losartan auf stärker stimulierte Monozyten möglich. Eine Veränderung der CD54-Expression bei AT1-Antikörper-Stimulation durch Losartan ist nicht belegbar (9 Versuche, Signifikanz 0.36).

Versuche zum Einfluß von	N	CD11B für	Mittelwert	Standardabweichung	MW-Diff.	Sig. (2seitig)
Losartan bei AT	7	AT+L	1283,71	496,15	-55,86	,520
	7	AT	1339,57	559,99		
Losartan bei AT1-AK	7	AT1-AK+L	1380,57	572,24	-65,71	,302
	7	AT1-AK	1446,29	643,37		

Tabelle 20: T-Test für CD11b bei gepaarten Stichproben. In jeweils N Versuchen wurde die Expression von CD11b (als MFI) nach Stimulation mit AT bzw. AT1-AK mit der Expression nach Stimulation mit Losartan und AT (AT+L) bzw. AT1-AK verglichen (Versuche ohne ISO-AK, deshalb MW erhöht).

Die Expressionserhöhung von CD49d durch den AT1-AK ist von so geringer Amplitude, daß ein Einfluß von Losartan nicht nachweisbar ist. Bei fehlender Stimulierbarkeit durch AT und AT1-Antikörper hat Losartan wie erwartet keinen nachweisbaren Einfluß auf die Expression von CD31, CD49, CD44, CD62L und CD11a.

4.3.4. Unterschiede der Stimulation bei Hypertonie versus Normalkontrollen

Für die bei Hypertonie verändert exprimierte Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b und CD54 ergibt sich die Frage, ob Hypertonie nicht nur eine erhöhte Grundexpression, sondern auch ein verändertes Verhalten bei Stimulation bedingt. Die CD11a Expression ist unabhängig von den untersuchten Stimulanzen. Für CD11b und CD54 wurde das Stimulationsverhalten von Monozyten bei Hypertonie mit dem Stimulationsverhalten von Monozyten normotoner Probanden verglichen.

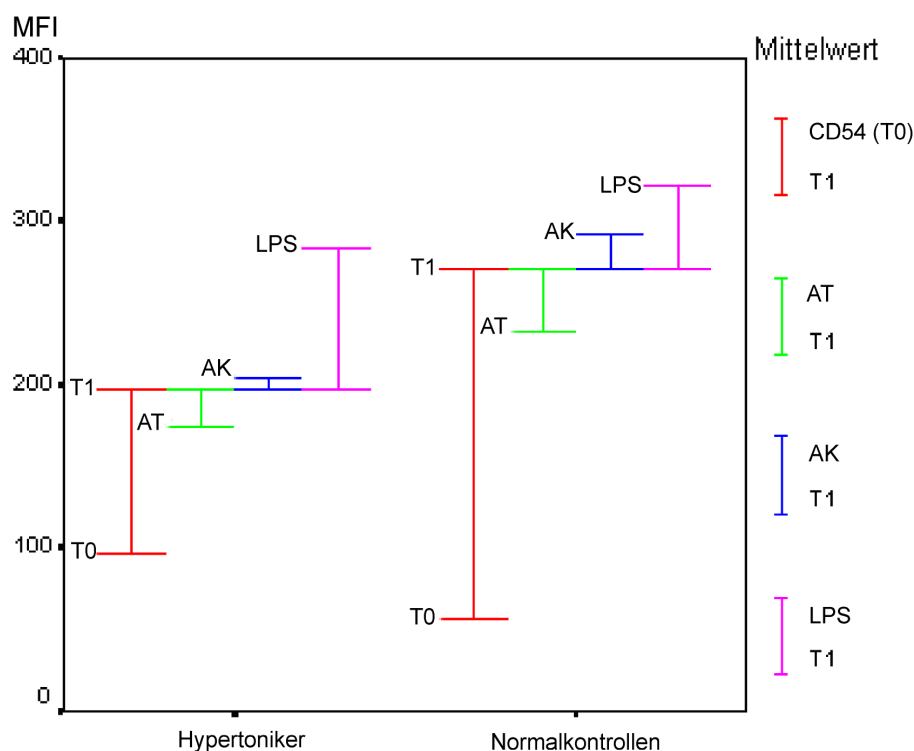


Abbildung 36: Veränderte CD54 Expression nach Inkubation. MW der CD54-Fluoreszenz (angegeben als MFI) nach Inkubation (T1) im Vergleich zur Expression direkt nach Isolierung (T0) bzw. Stimulation mit AT, AT1-AK (AK) und LPS, aufgeschlüsselt für Hypertoniker und Normalkontrollen

Abb.36 und Abb.37 belegen anhand der Mittelwerte der CD54- bzw. CD11b-Expression, dass alle untersuchten Stimulanzen bei Monozyten von Hypertonikern und Normalkontrollen qualitativ gleichartige Expressionsveränderungen bewirken. Die Inkubation ist für CD11b expressionserniedrigend und bewirkt ausgehend von einer erhöhten CD54-Grundexposition bei Hypertonie eine größere Amplitude der CD54-Expressionserhöhung bei Normalkontrollen. AT

erniedrigt CD54 und erhöht CD11b. AT1-Antikörper- und LPS-Stimulation bewirken sowohl bei Hypertonikern als auch bei Normalkontrollen eine erhöhte Expression von CD54 und CD11b. Tendenziell reagiert bei Hypertonie ein höherer Anteil der Probanden auf LPS-Stimulation mit Expressionserhöhung von CD54 bzw. CD11b. Für die Stimulation mit AT- und AT1-AK sind keine Unterschiede bei Hypertonie feststellbar. Allerdings ist die Aussagekraft auf Grund der geringen Versuchszahl pro Gruppe bei sehr hoher Standardabweichung und heterogener Empfindlichkeit auf AT Stimulation (lt. Luft 2002) eingeschränkt. Quantitative Aussagen sind auf Grund der nicht identischen Versuchszahlen pro Gruppe nicht möglich.

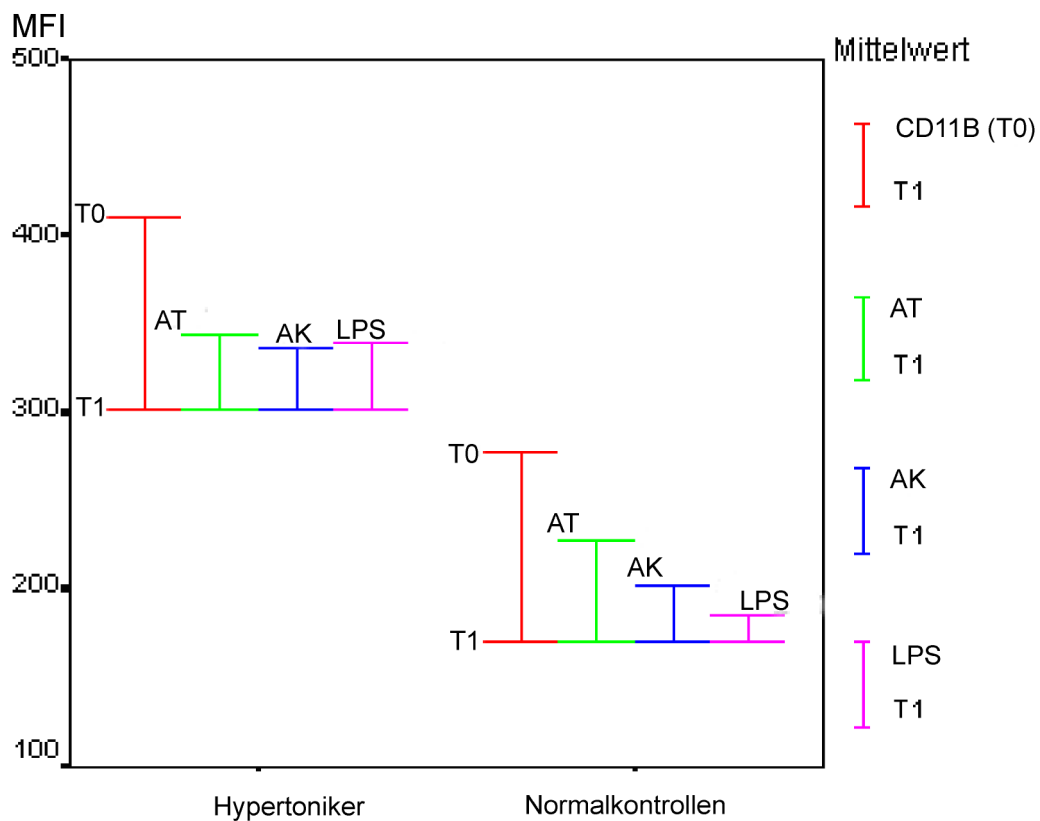


Abbildung 37: Veränderte CD11b -Expression nach Inkubation. MW der CD11b-Fluoreszenz (als MFI) nach Inkubation (T1) im Vergleich zur Expression direkt nach Isolierung (T0) bzw. Stimulation mit AT, AT1-AK (AK) und LPS, aufgeschlüsselt für Hypertoniker und Normalkontrollen.

Zur AT1-AK-Stimulation von CD11b wurden 13 weitere Versuche mit einem neu isolierten AT1-Autoantikörper höherer Reinheit durchgeführt. Da die Messungen bei veränderter Verstärkung durchgeführt wurden, konnten die Versuche nicht in den Vergleich Hypertonie-Normalkontrollen einbezogen werden, belegen jedoch ebenfalls eine signifikant erhöhte CD11b-Basis-Expression ($p=0.08$) bei Bluthochdruck sowie eine signifikante Expressionserhöhung von CD11b ($p=0.000$) bei AT1-AK-Stimulation isolierter Monozyten (Abb.38). Der verwendete AT1-AK bewirkt bei Normalkontrollen und Hypertonikern eine Expressionserhöhung von CD11b auf 4-5fache Werte der Basalexpression.

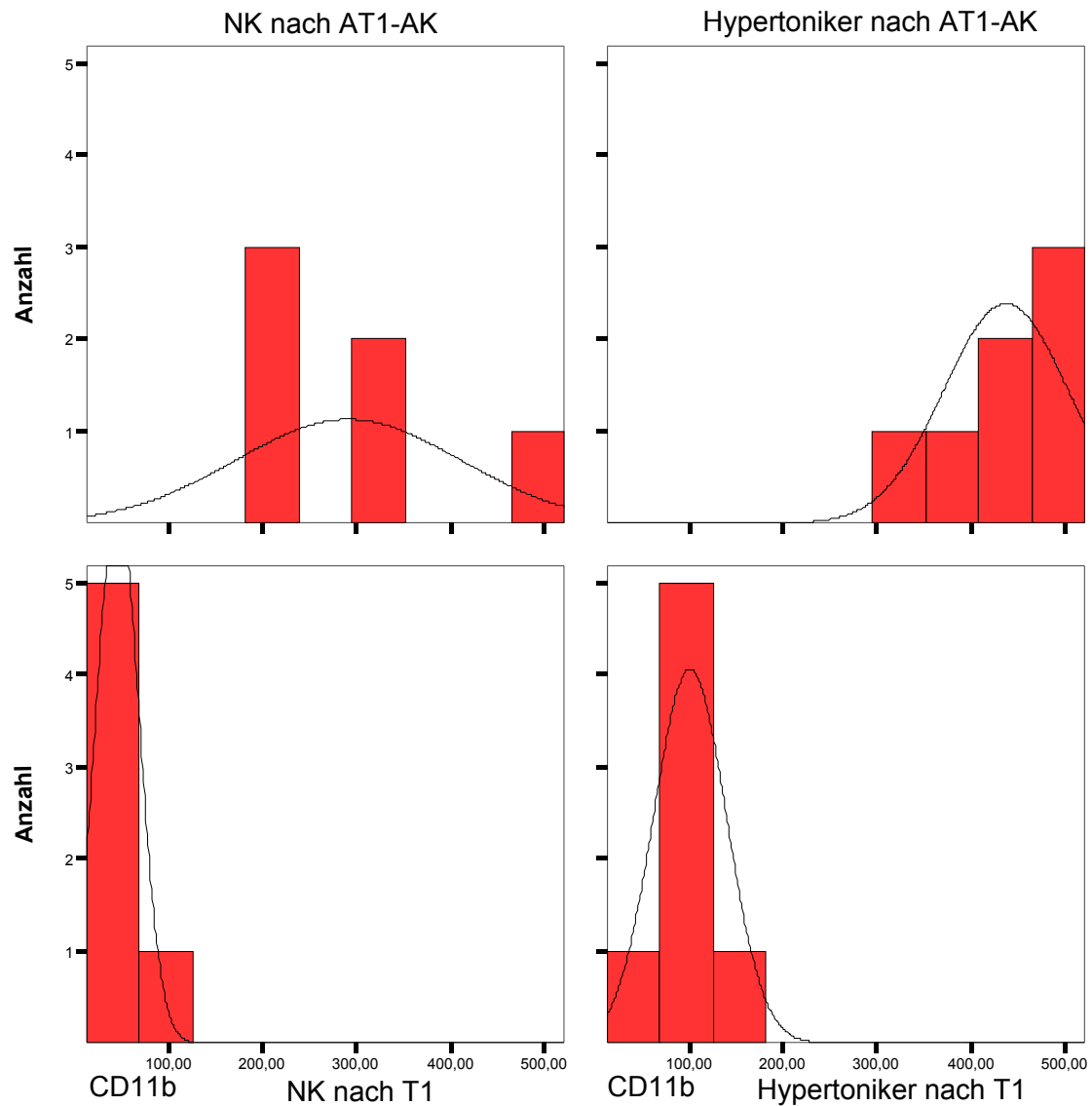


Abbildung 38: Häufigkeitsverteilung der CD11b-Expressionshöhe (angegeben als MFI) bei AT1-AK Stimulation, aufgeschlüsselt für Hypertoniker und NK. Die unteren Diagramme stellen die Verteilung bei unstimulierten, inkubierten Monozyten (T1) dar, jeweils darüber die CD11b-Expression nach AT1-AK Stimulation.

5. Diskussion

Die zentrale Rolle der Monozyten bei Infektabwehr, malignen Prozessen und Arteriosklerose macht sie zu einem faszinierenden Forschungsgebiet. In den letzten Jahren konnten die für die Monozytenadhäsion verantwortlichen Rezeptoren charakterisiert werden. Diese Adhäsionsmoleküle sind auch bei der Interaktion Antigen-präsentierender Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems von Bedeutung. Die vorgelegte Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der Rolle der Monozyten bei essentieller Hypertonie leisten.

5.1. Effekte von Monozytenisolierung und Inkubation auf die Adhäsionsmoleküle

Makrophagenvorläufer des Knochenmarks durchlaufen verschiedene Replikations- und Differenzierungsstufen, bevor sie als zirkulierende Monozyten in das Blut gelangen. Blutmonozyten migrieren nach ca. einem Tag in die Gewebe, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. Dieser Differenzierungsprozeß wird durch verschiedenste Zytokine kontrolliert und führt zu morphologischen Veränderungen.

Ursprung, Differenzierungsgrad und Umwelteinflüsse beeinflussen die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten, Monozyten und Makrophagen. So werden selektive Veränderungen der Oberflächen-Expression von Adhäsionsmolekülen während der Reifung menschlicher Blutmonozyten *in vivo* und *in vitro* z.B. von Stent et al. 1997 beschrieben. Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten sind somit nicht nur durch Expression spezifischer Oberflächenmarker (wie z.B. CD14), sondern auch durch ein typisches Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen zu unterscheiden. CD11a, CD11b und CD54 auf durch Monozytenkultur gewonnenen Makrophagen sind erhöht, dagegen ist die basale Expression von CD62L auf Monozyten signifikant höher als auf Alveolarmakrophagen (Haugen et al. 1999).

Verschiedene Autoren haben belegt, daß die *ex vivo* Manipulation von Monozyten während des Isolierungsprozesses und der Inkubation die Expression von Adhäsionsmolekülen beeinflussen kann. Laut Stent et al. 1997 erhöhte die Isolierung mittels Plastikadhärenz die Expression von CD11b und CD54 auf das 3- bis 8-fache, dagegen blieb CD11a unverändert. Macey et al. 1995 beobachtete eine CD11b Erhöhung nach Dichte-Gradienten-Zentrifugation über Ficoll.

Wir haben deshalb einige Effekte der Monozytenisolierung untersucht: die Expression von Adhäsionsmolekülen direkt nach Erythrolyse von Vollblut, nach Dichte-Gradienten-Zentrifugation über Ficoll und nach Isolierung mittels Plastikadhärenz bzw. Dyna-Beads. Die Expression nach Erythrolyse diente dabei unter der Annahme der geringsten Monozytenaktivierung als Vergleichswert.

Die Dyna-Bead-Negativ-Isolierung und Zentrifugation über Ficoll erhöhen CD11b. Die beobachtete Expressionsveränderung auf ca. doppelte Werte ist dabei wesentlich niedriger als die in der Literatur beschriebene 7- bis 8-fache Erhöhung bei Isolierung mittels Plastikadhärenz (Stent et al. 1997) und die Isolierungsreinheit ist höher.

Die fehlende Aktivierung weiterer Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM-1 (CD54) durch Negativ-Bead-Isolierung ist vorteilhaft im Vergleich zur Isolierung mittels Plastikadhärenz. CD11a bleibt unbeeinflusst von den unterschiedlichen Isolierungsschritten. Auch die Expression von CD44 und CD54 nach Isolierung entspricht im wesentlichen der Expression im Vollblut. Dem geringfügig erhöhenden Einfluß der Zentrifugation steht dabei ein erniedrigender Einfluß der Bead-Isolierung entgegen. Für CD29, CD49d, CD31 und CD 62L wirkt die Isolierung sowohl durch die Zentrifugation und durch die weiteren Isolierungsschritte erniedrigend. Die niedrigen CD62L Spiegel nach Isolierung sind als Aktivierung erklärbar (Macey et al. 1995).

Bei Inkubation in Suspension bleibt CD11a konstant. Lt. Stent et al. 1997 nimmt bei längerer Zellkultur (>5 Tage) in adhärennten Plastik-Schalen der Anteil und die Fluoreszenzintensität der CD11a exprimierenden Zellen ab. Dieser Effekt tritt bei der von uns gewählten Suspensionskultur und einer Inkubationsdauer von 7 h bis max. 48 h nicht auf.

In unseren Experimenten ist eine signifikante Erhöhung der CD54 Fluoreszenzstärke nach Inkubation in Suspension festzustellen. Während Dougherty et al. 1988 eine adhäsionsabhängige Stimulation von CD54 durch Adhäsion an Fibronectin beschichteten Oberflächen postuliert, belegen Stent et al. 1997 und Arkin et al. 1991 eine mit Inkubationsdauer zunehmende CD54 Expression unabhängig von der Inkubationsart, also auch ohne die Notwendigkeit zellulärer Adhäsion. Die Expressionsstärke von CD44 wird durch Inkubation erhöht, CD31, CD11b (entsprechende Ergebnisse für Lymphozyten von Haugen et al. 1999) und CD49d (entsprechende Ergebnisse von Rubio et al. 1995) werden durch Inkubation signifikant erniedrigt. Die Inkubation in Suspension weist somit nicht die für Aktivierung typische

Erhöhung von CD11b bzw. kein Makrophagenexpressionsmuster (CD11a, CD11b und CD54 erhöht lt. Haugen et al. 1999) auf.

Zusammenfassend verändern unterschiedliche Manipulationen die Adhäsionsmoleküle in komplexer Weise. Während die Isolierung eine Expressionserhöhung von CD11b bewirkt, erniedrigt die Inkubation diesen Aktivierungsmarker. Für CD31, CD49d, CD62 L wirken sowohl Isolierung als auch Inkubation expressionserniedrigend. Dagegen werden CD54 und CD44-Expression durch Zentrifugation über Ficoll erhöht, durch die Bead-Isolierung erniedrigt und durch Inkubation erhöht. Es gibt keine Isolierungs- oder Inkubationsmethode ohne Expressionsveränderung der Adhäsionsmoleküle auf Monozyten. Obwohl Monozyten im Vollblut vergleichsweise unverändert sein dürften, weist Macey et al. 1995 auch eine Aktivierung durch Erythrolyse nach. Es ist deshalb wesentlich, die durch in vitro Manipulationen verursachten Veränderungen der Adhäsionsmolekül-Expression von der Expression in vivo abzugrenzen. Wir verwendeten zur Vermeidung von Adhäsionsaktivierung die Negativ-Isolierung mittels Dynabeads und Inkubation in Suspension in PP-Tubes. Da Monozyten von Hypertonikern und Normalkontrollen in gleichem Maße allen Manipulationen ausgesetzt wurden, gelangten wir zu verwertbaren vergleichenden Aussagen.

5.2. Analyse möglicher Einflußfaktoren

Um zu evaluieren, ob Alter oder Blutdruck die Expression der Adhäsionsmoleküle auf Monozyten beeinflusst, bestimmten wir die Korrelation zwischen Alter, systolischem sowie diastolischem Blutdruck und der Expression der einzelnen Adhäsionsmoleküle.

Blutdruck: Lösliches ICAM-1 und IL-6 korreliert mit dem Blutdruck (DeSouza et al. 1997, Chae et al 2001). Dörffel 2002 berichtete von einem Zusammenhang zwischen systolischem Blutdruck und der Interleukin 1 Sekretion bei AT-stimulierten Monozyten von Hypertonikern. Entsprechend wiesen wir eine signifikante Korrelation zwischen diastolischem Blutdruck und der Expression der ICAM-1 Liganden CD11a und CD11b und von CD54 auf Monozyten nach.

Alter: Lt. Stohlawetz et al. 1998 sind CD11b und CD49d nicht mit dem Alter korreliert, die CD29-Expression weist eine positive Korrelation mit dem Alter auf. Die Expression von CD31 ist alterskorreliert, CD44 dagegen altersunabhängig (Masuda et al. 1998). Lösliches ICAM-1 korreliert nicht mit dem Alter (DeSouza et al. 1997) und die Zytokinsekretion von Monozyten ist ebenfalls altersunabhängig (Dörffel 2002).

In unserer Studie korrelierte nur die CD11a-Expression signifikant mit dem Alter. Keine Alterskorrelation bestand für CD11b, CD54, CD44, CD49d. Da für CD29 und CD31 keine Unterschiede in der Expression bei Hypertonie feststellbar waren, ist eine eventuell bestehende Alterskorrelation für unsere Untersuchungen unwesentlich.

Geschlecht: Es besteht keine statistisch relevante Relation zwischen der Adhäsion unstimulierter Monozyten zu HUVEC und Geschlecht (Dörffel 2002). Ley 2001 postuliert, daß Östrogene zwar über eine Herabregulation von VCAM-1 auf Endothelzellen antiinflammatorisch wirken, aber keine Änderung von ICAM-1 bedingen. Auch in unserer Studie korrelieren Geschlecht und Adhäsionsmolekülexpression nicht.

Hyperglykämie hat einen additiven Effekt bezüglich der Adhäsion von Monozyten an das Endothel (Tsao et al. 1998). Ein erhöhter Glucosespiegel bewirkt bereits nach 3h eine Expressionserhöhung von CD54 auf dem Endothel. Es ist dabei ungeklärt, ob die gesteigerte Adhäsion zusätzlich durch Veränderungen der Monozyten bedingt ist. Anamnestischer Diabetes und Hyperglykämie waren Ausschlußkriterien der Studie.

Rauchen: Zigarettenrauchkonzentrat induziert eine erhöhte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf HUVEC und eine PECAM vermittelte erhöhte Monozyten-Migration (Shen et al. 1996). CD11b auf Monozyten wird auch nach Kontakt mit Zigarettenrauch exprimiert (Kalra et al. 1994). Die daraus resultierende Adhäsionserhöhung ist mittels monoklonalem CD11b-Antikörpers blockierbar. Da Rauchen ein Ausschlußkriterium unserer Studie ist, scheidet dieser Aktivierungsmechanismus aus.

LDL kann die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen induzieren. Allerdings scheint dieser Prozeß nicht über veränderte Expression der Adhäsionsmoleküle auf Monozyten vermittelt zu sein, da VLA 4 und LFA-1 unbeeinflußt vom LDL Spiegel sind (de Bount et al. 1999). CD11b wird nach LDL Stimulation unverändert exprimiert (Couffinthal et al. 1999). Schmitz et al. 1998 wies einen mit Hypercholesterinämie assoziierten inflammatorischen Phänotyp der zirkulierenden Monozyten nach. Da dieser CD14 nur gering exprimiert, beeinflußt er unsere Auswertung der deutlich CD14 positiven Monozyten nicht.

Zusammenfassend scheinen Geschlecht, LDL, Hyperglykämie und außer bei CD11a auch das Alter keinen signifikanten Einfluß auf die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten

zu haben. Trotzdem galten ein verändertes Lipidprofil, Diabetes und Nikotinabus als Ausschlußkriterium. Geringfügige Abweichungen bezüglich Alter und Geschlecht in Kontroll- und Patientengruppe dürften vernachlässigbar sein. Für CD11a wurde eine Alterskorrektur berücksichtigt.

Obwohl eine Anamnese von Herzinfarkt, Schlaganfall und pAVK einen Studienausschluß bedingen, ist die Existenz früher arteriosklerotischer Läsionen bei Hypertonie nicht auszuschließen und sicher einer der wesentlichsten Fehlerfaktoren, welcher eventuell eine zusätzliche, über Endothelschäden vermittelte Veränderung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten bewirken könnte. Zwischen arteriosklerotischen Läsionen und der Interleukin 1 Sekretion von Monozyten bei Hypertonie konnte keine signifikanter Zusammenhang belegt werden (Dörffel 2002). Auch bei gesunden Männern ist der lösliche ICAM-1 Serumspiegel mit dem Blutdruck signifikant korreliert (Chae et al. 2001). Somit scheint die Aktivierung von Monozyten bei Hypertonie unabhängig bzw. zusätzlich zu arteriosklerotischen Entzündungen zu bestehen. Durch die von uns nachgewiesene signifikante Korrelation zwischen diastolischem Blutdruck und Expression von CD11a, CD11b und CD54 ist anzunehmen, daß die gemessenen Expressionsveränderungen im wesentlichen Hypertoniebedingt sind.

5.3. Veränderte Adhäsionsmoleküle bei Hypertonie

Hypertonie ist mit der Entwicklung von Arteriosklerose eng assoziiert. Die Adhärenz von Blutmonozyten an das Endothel gefolgt von der Transmigration durch das Endothel sind initiale Ereignisse für die Bildung von Schaumzellen, die Arteriosklerose verursachen. Dabei steigt die Evidenz, daß eine veränderte Immunfunktion für einige der Endorganschäden chronischer arterieller Hypertonie verantwortlich zeichnet. Manifestationen der veränderten Immunfunktion bei Hypertonie sind eine erhöhte Anzahl zirkulierender Monozyten, eine erhöhte Anzahl zirkulierender aktivierter Monozyten (Dörffel et al. 2001) und eine erhöhte Leukozyten-Endothel-Adhäsion nach Stimulation mit Entzündungsmediatoren (Liu et al. 1996). Bataillard et al. 1995 wies bereits eine Blutdruckreduktion durch das selektive Monozytotoxin Silica bei Ratten nach. Da die auf der Oberfläche von Leukozyten (z. B. CD11/CD18, L-Selektin) und Endothelzellen (z.B. ICAM-1, VCAM-1) exprimierten Adhäsionsmoleküle wesentlich für den Adhäsionsprozeß in Mikrogefäßen sind, wurde angenommen, daß sich die veränderte Immunfunktion bei Hypertonie in der veränderten Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche zirkulierender Blut-Leukozyten und /oder von Endothelzellen reflektiert.

Obwohl Leukozytenadhäsion an Endothelzellen essentiell für Abwehr- und Reparaturprozesse ist, können adhärente Leukozyten auch Endothel-Läsionen und Dysfunktionen bedingen, welche mit einer Anzahl kardiovaskulärer Krankheiten assoziiert sind. Für die Risikofaktoren kardiovaskulärer Krankheiten wie Hypertonie, Diabetes und Hypercholesterinämie konnte eine erhöhte Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothel nachgewiesen werden (Komatsu et al. 1997). Es ist belegt, dass Bluthochdruck eine endotheliale Dysfunktion und die subendotheliale Akkumulation von Monozyten bedingt (Clozel et al. 1991, Liu et al. 1996, Suzuki et al. 2001, Ross et al. 1993).

In anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wird der inflammatorische Mechanismus der Hypertonie betont und demonstriert, daß die zirkulierenden humanen Monozyten bei Hypertonie einen Status erhöhter Aktivität aufweisen (Dörffel et al. 2001, 2002). Die spontane Adhäsion von Monozyten an HUVEC ist bei Hypertonikern signifikant erhöht (Dörffel et al. 2001).

Wir weisen als phänotypischen Hinweis auf einen vermehrten Aktivierungszustand eine signifikant erhöhte Expression von CD11a, CD11b und CD54 auf zirkulierenden Monozyten bei Hypertonie nach. Es besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen diastolischem Blutdruck und der Expression von CD11a, CD11b, CD54, nicht jedoch zum systolischen Blutdruck. Tendenziell ist auch CD49d bei Hypertonie erhöht. CD31, CD44, CD62L und CD29 sind nicht nachweisbar verändert. Ähnliche Aktivierungsmuster belegt Meisel et al. 1998 bei Myokardinfarkt.

Die sequentielle Adhäsionskaskade gibt einen Erklärungsansatz für die beobachteten Expressionsveränderungen. Die aktivierten Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und MAC-1 (CD11b/CD18) sowie ihre Bindung an ICAM-1 (CD54) sind Zeichen der Monozytenaktivierung in der frühen Arrest-Phase der Adhäsion. Die Integrinrezeptoren sind auch Bindungsstellen für Bakterien und LPS (Ammon et al. 2000) und normalerweise im inaktivem Zustand. ICAM-1 hat möglicherweise eine zusätzliche Funktion in der Phase des Monozyten-Rollens (Ley 1996). CD49d wird als Bestandteil von VLA-4 in erheblichem Maße von Monozyten exprimiert und ist als Ligand für VCAM-1 wesentlich zur Bindung rollender Monozyten (slow rolling). Da VCAM-1 und ICAM-1 im Serum von Hypertonie Patienten erhöht sind (Dörffel et al. 2001), kann eine vermehrte Expression von CD49, CD11a und CD11b vermutet werden. Bei dem Minuten nach Aktivierung durch Abspaltung massiv herabregulierten L-Selektin (CD62) sind

zusätzliche Aktivierungsänderungen durch Hypertonie schwer zu bestimmen. CD31 und CD29 (als Bestandteil von VLA) sind erst für spätere Prozesse der Diapedese verantwortlich und nicht Zeichen einer Voraktivierung der Monozyten. CD29 wird außerdem normalerweise bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen exprimiert (Ammon et al. 2000). CD44 ist vorwiegend für das Lymphozytenhoming verantwortlich. Eine vermehrte Expression war nicht zu erwarten.

In Übereinstimmung weist Faas et al. 2000 eine Erhöhung von CD11a, CD11b und CD49d sowie eine Erniedrigung von CD62L bei Ratten mit Endotoxin induzierter Präeklampsie nach und folgert daraus, daß Präeklampsie aus einer generalisierten Entzündungsantwort resultiert. Bei Hypertonie ist CD11a erhöht (Mills et al. 2002). Mervaala et al. 1999 belegt eine Erhöhung von CD11a und CD49d auf Monozyten von Ratten mit renaler Hypertonie.

Auch bei Arteriosklerose und Ischämie sind Adhäsionsmoleküle auf Leukozyten herauf- bzw. herabreguliert: Auf Monozyten von Patienten mit akutem Myokardinfarkt werden CD11a, CD11b, CD54 und CD49d verstärkt exprimiert (Meisel et al. 1998). Kim et al. 1995 und Xiong et al. 1998 maßen eine Erhöhung von CD11a und CD11b auf Monozyten nach ischämischem Schlaganfall. Die Expression von CD11b auf Monozyten bei chronischem Nierenversagen ist signifikant erhöht, was eine mögliche Erklärung für die erhöhte Inzidenz von KHK bei diesen Patienten wäre (Al-Saady et al. 1999).

Bei KHK sind lt. Masuda et al. CD31 und CD44 auf Monozyten erhöht, was auf einen Mechanismus veränderter Chemotaxis bei Arteriosklerose hinweist. Dabei bewirkt eine beginnende Hypertonie andere Adhäsionsmolekülveränderungen als Arteriosklerose, welche zusätzlich Adhäsionsmoleküle der Diapedese wie CD31 und CD44 aktiviert.

Auf dem Endothel bewirkt chronischer Bluthochdruck und mechanischer Streß eine erhöhte Expression von ICAM –1 (Komatsu et al. 1997, Suzuki et al. 2001, Nakashima et al. 2000, Cheng et al. 1996). Die von Endothelzellen und Monozyten ausgeschütteten löslichen Adhäsionsmoleküle ICAM –1 und VCAM-1 sind bei Hypertonie erhöht (DeSouza et al. 1997, Buemi et al. 1997, Dörffel et al. 2001). Dagegen bleibt das nur von Endothelzellen produzierte E-Selektin bei Hypertonie ohne Arteriosklerose unverändert (Dörffel et al. 2001). Ein kurzfristiger Druckanstieg erhöht bei Normalkontrollen die Menge löslicher Adhäsionsmoleküle, verändert jedoch nicht die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b und CD49d auf Monozyten (Buemi et al. 1997). Da auch das lösliche E-Selektin erhöht ist, widerspiegeln diese

Messungen die endotheliale Aktivierung durch Sher-Streß. Dieses unterstützt die Hypothese, daß die Monozytenaktivierung bei Hypertonie auch unabhängig von Sher-Streß bedingter Endothelzellschädigung besteht.

Der ICAM-1 Serumspiegel ist auch bei gesunden Männern mit dem Blutdruck signifikant korreliert (Chae et al 2001). Dörffel et al. 2001 belegt aktivierte Monozyten bei hypertonen Patienten ohne Nachweis einer Intimaverdickung als Zeichen von endotheliale Schaden. Während generell angenommen wird, daß die Sekretion von Endothelzell-Faktoren die Monozytenaktivierung verursacht, postulieren wir außerdem voraktivierte Monozyten bei chronischer Hypertonie.

Aus unseren Ergebnissen ist nicht ableitbar, ob voraktivierte Monozyten bei Hypertonie ein Epiphänomen oder ein ursächlicher Faktor für Hypertonie und Arteriosklerose sind. Da sich Monozyten im Blut die meiste Zeit in Niedrig-Druck Gebieten befinden, ist es unwahrscheinlich, daß der hohe Blutdruck direkt eine Aktivierung der Monozyten bedingt. Für eine durch Arteriosklerose bedingte Monozytenaktivierung würde lt. Masuda et al. 1998 ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Adhäsionsmolekülexpression typisch sein.

Die Vermutung, daß Hypertonie ein Prozeß generalisierter Entzündung ist und nicht der Blutdruck direkt für die beschriebenen Langzeitschäden verantwortlich zeichnet, wird auch durch Studien belegt, die eine Unabhängigkeit der arteriosklerotischen Schäden von der Einstellung der Blutdruckhöhe belegen. Die Behandlung mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A reduziert über IL-6 Suppression die Endorganschäden bei AT oder Cholesterin induzierter Hypertonie signifikant (Wambach et al. 1994, Mervaala et al. 2000). Eine Behandlung mit ASS als Inhibitor von Entzündungsmediatoren verringert die Endorganschäden bei AT induzierter Hypertonie deutlich, obwohl der Blutdruck nicht beeinflußt wird (Muller et al. 2002, Mervaala et al. 2000). Dabei hemmt hoch dosiertes Aspirin die Infiltration von Monozyten, während niedrig dosiertes ASS nur die Anzahl der CD4 positiven T-Lymphozyten verringert und keinen Effekt auf NF- κ B hat.

Die Frage nach einer möglichen Voraktivierung der Monozyten durch die gewählte Isolierungsmethode ist nicht unberechtigt. Sie wird von geringerer Bedeutung durch Wahl einer möglichst günstigen Isolierungsmethode und durch den Vergleich von Monozyten hypertensiver Patienten mit denen normotoner Kontrollpersonen, deren Monozyten auf die gleiche Art isoliert wurden.

Es ist nicht auszuschließen, daß nur Untergruppen der Monozyten im zirkulierenden Blut nachweisbar sind.

5.4. Einfluß von Aktivatoren auf die Expression von Monozytenadhäsionsmolekülen

5.4.1. LPS

Das Endotoxin LPS wird als potenter Aktivator von Monozyten beschrieben. Es aktiviert im Gegensatz zu anderen Stimulanzien die angeborene Immunantwort der Monozyten (Langstein et al. 2000). LPS erhöht die Adhäsion von Monozyten signifikant (Dörffel et al. 1999).

Wir stellten für CD11b und CD54 eine signifikante Erhöhung der Expression nach LPS Stimulation fest. Entsprechendes berichtet Haugen et al. 1999 für CD11b und Rubio et al. 1995 für CD54. Die Expressionserhöhung von CD54 ist nach 4 h nachweisbar, nach 24 h maximal und nach 72 h langsam abnehmend. Die Expression von L-Selektin auf Monozyten wird in unseren Versuchen durch LPS Stimulation erniedrigt, was Ergebnissen von Haugen et al. 1999 entspricht. L-Selektin wird bei Aktivierung abgespalten. Die erniedrigte Expression von L-Selektin und die erhöhte CD11b- und CD54-Expression kennzeichnet Monozytenaktivierung. In Übereinstimmung mit Literaturangaben beeinflußt LPS die CD49d Expression nicht. Die CD31 Expression wird geringfügig erniedrigt.

In unseren Experimenten bleibt CD11a (entsprechend Stent et al. 1997) bei Stimulation konstant. Haugen et al. 1999 beobachtet dagegen die Fähigkeit von Monozyten, auf LPS Stimulation mit erhöhter Expression von CD11a zu reagieren. Alveolarmakrophagen fehlt die Fähigkeit zur Hochregulation von CD11a. Die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich CD11a könnten somit durch Einbeziehung verschiedener Entwicklungsstufen von Monozyten bedingt sein. Wahrscheinlicher scheint der Einfluß weiterer Einflüsse bei Haugen et al. 1999.

Für die LPS Stimulierbarkeit von Adhäsionsmolekülen auf Endothel existieren gegensätzliche Ergebnisse: Lt. Komatsu et al. 1997 erhöht 5-stündige Stimulation mit LPS oder TNF α die ICAM-1 Expression der Endothelzellen aller Gewebe sowohl bei normotensiven als auch bei hypertensiven Ratten. Die Höhe der LPS induzierten ICAM-1 Expression in Herz und Gehirn war jedoch bei Hypertonie signifikant niedriger. Andere Publikationen belegen widersprüchlich eine erhöhte Expression von ICAM-1 auf kultivierten Endothelzellen hypertensiver Rattenhirne nach LPS Stimulation (McCarron et al. 1994). LPS ist in vivo ein so potentes Adhäsionsstimulans, daß aufgrund der massiven Monozytenaktivierung kein Adhäsions-

Unterschied bei Hypertonie zu beobachten ist (Dörffel 2002). In unseren Versuchen ist der Anteil der durch LPS stimulierbaren Probanden bei Hypertonie etwas höher. Eine erhöhte ICAM-1 (CD54) Expression auf dem Endothel entspricht der von uns belegten CD11b Expressionserhöhung als zugehörigem Liganden auf Monozyten.

Bei hypertonen Ratten können erhöhte Spiegel von Glukokortikoiden nachgewiesen werden. Glukokortikoide unterdrücken die LPS induzierte Erhöhung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf kultivierten Endothelzellen (Cronstein et al. 1992). Die erhöhten Kortikoidspiegel könnten eine Erklärung für die verringerte LPS Stimulierbarkeit der Adhäsionsmoleküle hypertoner Ratten in vivo versus in vitro und ein weiterer Hinweis auf die inflammatorischen Mechanismen bei Hypertonie sein.

Der Expression von typischen Adhäsionsmolekülen auf Monozyten durch LPS-Stimulation gramnegativer Bakterien kommt insbesondere in Beachtung der möglicherweise zusätzlichen infektiösen Ätiologie arteriosklerotischer Prozesse Bedeutung zu. So ist bei chronischer Chlamydieninfektion eine LPS -vermittelte Aktivierung der Adhäsionsmoleküle auf Monozyten mit nachfolgender Endotheladhäsion denkbar.

5.4.2. Angiotensin II

AT ist als wesentlicher Faktor in der Pathogenese von Hypertonie und Arteriosklerose bekannt. Gegenwärtig haben die Erkenntnisse von AT und seiner Funktion bei Zell-Proliferation, Hypertrophie und Immunmodulation die Aufmerksamkeit auf die lokale AT Generation und Effekte fokussiert (Bader et al. 2001). Die u. a. inflammatorische Wirkung von AT auf Monozyten wird vorwiegend über den AT1-Rezeptor vermittelt, der auch von Monozyten exprimiert wird (Hahn et al. 1994).

AT wurde als Stimulus verwendet, da es u. a. von den Gefäßzellen physiologischer Weise produziert wird und ein Teil der Hypertoniker einen erhöhten AT Plasmaspiegel aufweist (Lüschnner et al. 1995). AT-Stimulation kommt den pathophysiologischen Verhältnissen der Hypertonie am nächsten. Da AT keine Lymphozyten aktiviert, verfälschen eventuelle Verunreinigungen nicht die Stimulationsergebnisse (Kranzhöfer et al. 1999).

Wir können eine signifikante Erhöhung der Expression von CD11b auf Monozyten nach Stimulation mit AT in relevanten Konzentrationen nachweisen. Die Expression von CD54 wird dagegen tendenziell erniedrigt und alle weiteren untersuchten Adhäsionsmoleküle bleiben unbeeinflusst.

Entsprechend der Hypothese, daß Hypertonie unimodal und durch Variation verschiedenster Gene bedingt ist (Luft 2002), wurde über ein heterogenes Ansprechen auf AT berichtet. Die Standardabweichung ist bei AT Stimulation hoch (Dörffel et al. 2002). Der Polymorphismus des AT1-Rezeptorgens trägt zur Variabilität der Reaktion auf AT bei (Spiering et al. 2000). Bei geringer Versuchszahl können wir keinen signifikanten Unterschied der Expressionsveränderung bei AT Stimulation zwischen Hypertoniepatienten und Normalkontrollen belegen.

Dörffel et al. 2001 berichtet über eine vermehrte Adhäsion von AT-stimulierten Monozyten bei Hypertonie. Allerdings ist die Erhöhung der Adhäsion AT-stimulierter Monozyten im Vergleich zu unstimulierten Zellen nicht signifikant. Der widersprüchliche Einfluß von AT auf die Adhäsion widerspiegelt sich auch in unseren Ergebnissen, die unter AT Stimulation lediglich eine CD11b Erhöhung und eine leicht gegenläufige Veränderung für CD54 belegen. Das für den Prozeß der stabilen Monozytenadhäsion ebenfalls nötige CD11a wird nicht verstärkt exprimiert. Die veränderte Adhäsion bei Hypertonie ist eventuell durch nicht untersuchte Signalkaskaden, wie z.B. den Tissue Faktor, bedingt.

Unabhängig von einer durch Shear-Stress vermittelten Läsion der Endothelzellen ist bei aktiviertem RAS eine erhöhte Monozytenadhäsion (Mervaala et al. 1999) nachweisbar. Die Bindung der Monozyten ist mit einer ICAM-1 Expressionserhöhung auf Endothelzellen assoziiert (Tummala et al. 1999) und nicht durch eine Induktion von E-Selektin oder VCAM-1 induziert (Kim et al. 1996). AT bewirkt eine erhöhte Monozyteninfiltration in Rattennieren mit erhöhter Expression der Liganden für ICAM-1 (Mervaala et al. 1999). Diese Ergebnisse belegen unserer Beobachtung: Der durch AT induzierten erhöhte Exposition von CD11b auf Monozyten entspricht die Expressionserhöhung von ICAM-1 auf Endothelzellen. Allerdings ergibt sich die Frage, ob die Expression von CD11b auf Monozyten ein ursächlicher Faktor des veränderten Adhäsionsverhaltens bei AT Stimulation ist, oder nur ein Reaktion auf eine erhöhte ICAM-1

Expression des Endothels. Da der Effekt der CD11b Erhöhung an isolierten Monozyten beobachtet wird, betrachten wir ihn als primär.

Das vasoaktive Peptid AT kann inflammatorische Prozesse in menschlichen Monozyten und Endothelzellen aktivieren. Genauso wie LPS ist AT ein inflammatorischer Stimulus zur Expression von NF κ B in isolierten menschlichen Monozyten (Kranzhöfer et al. 1999, Muller et al. 2001, Theuer et al. 2002). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß AT und LPS in der Lage sind, Monozyten zu aktivieren. Das unterschiedliche Muster der Expressionsveränderung der Adhäsionsmoleküle läßt vermuten, daß der AT Signaltransduktionsmechanismus sich von der durch Endotoxin ausgelösten Signaltransduktion unterscheidet. Entsprechend belegt Dörffel et al. 1999, daß AT die IL-1 Produktion von Monozyten triggert, ohne TNF- α zu erhöhen, welches für LPS vermittelte Aktivierung typische wäre.

Bei RAS-induzierter Hypertonie aktiviert AT die Adhäsion von Monozyten über einen blutdruckunabhängigen Pfad. So ist durch den α -Agonist Phenylephrine kein Effekt auf die ICAM-1 Expression im Rattenendothel zu verzeichnen, obwohl der Blutdruck auf ähnliche Niveaus wie mit AT angehoben wird (Strawn et al. 1999). ACE-Hemmer und AT1-Rezeptorblocker bewirken im Gegensatz zu anderen Blutdruck senkenden Medikamenten unabhängig vom Einfluß auf den Blutdruck eine Verringerung der Gefäßläsionen und der ICAM Expression auf Endothelzellen bei für Renin und Angiotensinogen doppelt transgenen Ratten (Tummala et al. 1999). Auch die HOPE-Studie belegt die blutdruck-unabhängig kardioprotektive Wirkung von ACE-Hemmern (Kubitschek 2000). Eine Langzeitbehandlung mit AT1-Rezeptorblockern verdoppelt ähnlich einer Behandlung mit ACE-Hemmern die Lebenserwartung hypertensiver Ratten (Linz et al. 2000). Bei Ratten mit aktiviertem RAS bewirken sowohl Losartan als auch der Vasodilatator Hydralazine eine Normalisierung des Blutdruckes, aber nur Losartan erniedrigte die Anzahl der aktivierten zirkulierenden und der adherenten Monozyten sowie die Überexpression der Adhäsionsmoleküle in Rattennieren (Strawn et al. 1999, Mervaala et al. 1999). Der AT1-Rezeptorantagonist hat keinen Einfluß auf die Adhäsion von AT-stimulierten Monozyten der Normalkontrollen, während er die AT induzierte Adhäsionserhöhung hypertensiver Patienten verringert (Dörffel et al. 2001).

In unseren Versuchen erniedrigt Losartan die Expressionserhöhung von CD11b bei AT Stimulation geringfügig und ohne statistische Signifikanz. Allerdings ist der Einsatz von AT1-Rezeptorantagonisten in vivo (0,5 mg/kg/d oral) über 4 Wochen im Tierexperiment nicht mit

einer 30 minütigen Vorinkubation humaner Monozyten in vitro vergleichbar. Zudem ist die Versuchsanzahl gering. Beeinflussend könnte ebenfalls die gegebenenfalls nur für 72 h unterbrochene Therapie mit ACE-Hemmern bei einigen Hypertonikern sein. Die Wirkung von Losartan erfolgt eventuell von den untersuchten Adhäsionsmolekülen unabhängig über andere Signalkaskaden, wie z.B. eine Hemmung von Tissue Faktor.

Losartan wirkt auch über AT1-Rezeptor unabhängige Wege antiinflammatorisch und antikoagulativ: so ist für den Losartan Metaboliten EXP3179 eine Homologie mit dem Cyclooxygenasehemmer Indomethacin nachgewiesen (Kramer et al. 2002). EXP3179 reduziert die Prostaglandin-Bildung nach AT bzw. LPS Stimulation signifikant.

Zusammenfassend kann man postulieren, daß AT eine inflammatorische Reaktion mit direkter, AT1-Rezeptor vermittelter Monozytenaktivierung über Blutdruck abhängige und unabhängige Mechanismen verursacht. Bei einem Anteil der Patienten ist der Bluthochdruck möglicherweise durch ein aktiviertes RAS bedingt. Obwohl AT- und Renin-Spiegel bei essentieller Hypertonie größtenteils im Normbereich sind, ist eine lokale Aktivierung durch in Monozyten gespeichertes Renin und AT denkbar (Potter et al. 1998). Möglicherweise bewirkt eine veränderte Rezeptorempfindlichkeit (Homuth et al. 2000, Leung et al. 2001) bei normalen AT Spiegeln zusätzlich eine vermehrte Sensibilität auf AT. Ausdruck der Aktivierung durch AT Stimulation ist eine erhöhte CD11b Expression auf Monozyten. Bei Krankheiten mit aktiviertem Renin-Angiotensin System könnte diese erhöhte Expression des ICAM-1 Ligandens auf Monozyten zu Gefäßschäden führen.

5.4.3. Autoantikörper gegen den AT1-Rezeptor

Wallukat et al. 1999 beschreibt agonistische Autoantikörper gegen den AT1-Rezeptor im Serum von Patientinnen mit Präeklampsie, welche wie AT eine Signalkaskade initiieren, die zur Expression von Tissue Faktor in den glatten Muskelzellen von Koronararterien führt (Dechend et al. 2000).

Wir haben die Wirkung der von Wallukat bei Präeklampsie-Patientinnen isolierten AT1-Autoantikörper auf die Expression von Monozyten-Adhäsionsmolekülen untersucht. Für CD11b, CD54 und CD49d konnte ein signifikanter Anstieg der Expression nach AT1-AK Stimulation nachgewiesen werden. Die Expression von CD11a, CD31, CD44 und CD62L blieb unverändert.

Das aktivierte Integrin MAC-1 (CD11b/CD18) und seine Bindung an ICAM-1 (CD54) sind Zeichen der Monozytenaktivierung und typisch für die frühe Arrest-Phase der Bindung von Monozyten. CD49d ist als Bestandteil von VLA-4 Ligand für VCAM-1 und wesentlich zur Bindung rollender Monozyten. Eine für KHK typische Veränderung der für die Diapedese verantwortlichen CD31 bzw. CD44 Expression war nicht zu beobachten. Im Unterschied zum adhäsionsbedingtem Aktivierungsmuster, ist das für die Bindungsstabilisierung notwendige LFA-1 (CD11a/CD18) nicht erhöht.

Dörffel et al. 2002 belegt eine erhöhte Adhäsion AT1-AK-stimulierter Monozyten im Vergleich zu unstimulierten Monozyten. Mit AT1-AK und AT inkubierte Zellen weisen tendenziell eine höhere Adhäsion auf, als nur mit AT inkubierte Monozyten. Der AT1-Rezeptorblocker Eprosartan vermag es nicht vollständig, den Effekt der AT1-AK-Stimulation zu verhindern und die Erniedrigung ist ohne statistisch belegte Signifikanz. Auch Losartan hemmt den AT1-AK bedingten Frequenzanstieg an Rattenherzmuskelzellen nur teilweise (Homuth et al. 2000).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß AT1-AK neben AT-agonistischen weitere Signalkaskaden aktiviert. Entsprechend belegen unsere Messungen zusätzlich zu dem durch AT stimulierbarem CD11b eine Aktivierung von CD54 und CD49d durch AT1-AK.

In unserer Studie erniedrigt Losartan die Expression von CD11b auf AT1-AK-stimulierten Monozyten geringfügig. Die verwendeten AT1-AK-Konzentrationen waren zu gering, um einen deutlichen Expressionsanstieg von CD11b durch AT1-AK und folglich eine eindeutige Hemmung mittels Losartan zu verifizieren. Da die CD54 Expressionserhöhung durch AT1-AK nicht AT agonistisch vermittelt wird, war bei Blockade des AT1-Rezeptors keine Änderung zu erwarten.

Teilweise werden agonistische AT1-AK (Homuth et al. 2001, Leung et al. 2001) und eine vermehrte IgG Fraktion (Luther et al. 1997) bei essentieller Hypertonie beobachtet. AT1-AK sind ein weiterer Hinweis auf immunpathologische Veränderungen und ein möglicher zusätzlicher Faktor in der Pathologie der Hypertonie. Wie von uns belegt, können AT1-AK Adhäsionsmoleküle auf Monozyten in spezifischer Weise stimulieren. Damit sind sie im Sinne einer eventuellen Immunpathologie bei Hypertonie in der Lage, Entzündungsmechanismen zu aktivieren und arteriosklerotische Prozesse zu initiieren.

Die Assoziation von Arterioskleroserisiko bei Hypertonie und hohem Renin-Profil ist hinreichend bekannt (deGasparo et al. 2000, Aldermann et al. 1991), aber nur ca. ein Drittel aller Hypertoniker weist erhöhte Reninwerte auf. Eine veränderte Sensibilität auf AT (Leung et al. 2001) ist genauso wie lokale Aktivierung durch in Monozyten gespeichertes AT und Renin denkbar. Da bei 14-33% der Patienten mit maligner Hypertonie agonistische AT1-AK im Serum nachweisbar sind (Leung et al. 2001), ergibt sich die Frage, ob nicht für einige Hypertoniker AT1-Autoantikörper an der multifaktoriellen Genese des Bluthochdrucks Anteil haben.

Es konnte noch nicht gezeigt werden, wie AT1-AK den AT1-Rezeptor aktivieren. AT1-AK erkennen die AT-Bindungsstelle nicht. Sie binden dagegen an ein Epitop, daß an der zweiten extrazellulären Schleife des AT1-Rezeptors lokalisiert ist (Wallukat et al. 1999). Wir vermuten, daß AT1-AK die agonistische Konformation des AT1-Rezeptors stabilisieren (de Gasparo et al. 2000).

Ebenso fraglich bleibt die klinische Relevanz von Autoantikörpern gegen AT1-Rezeptoren. Vorstellbar sind Strategien zur Entfernung der Autoantikörper (z.B. Plasmapherese oder spezifische Immunadsorption), Anwendung von Glukokortikoiden zur Suppression des Antikörpereffektes (Theuer et al. 2002, Homuth et al. 2001) oder die Anwendung von Heparin zur Minderung der prokoagulatorischen Effekte der AT1-AK (Dechend et al. 2000). Da die pathophysiologische Bedeutung und das Ausmaß von AT1-AK bei essentieller Hypertonie nicht hinreichend bekannt sind, hat ein therapeutischer Einsatz dieser Methoden derzeit sicherlich keine klinische Relevanz und ist nur bei Präeklampsie oder maligner Hypertonie gegebenenfalls zu diskutieren. Denkbar wäre allerdings eine Therapie mit AT1-Rezeptor-Antagonisten, die zumindest teilweise die Wirkungen der AT1-AK inhibiert.

5.5. Bedeutung von Tissue Faktor in der Angiotensin-induzierten Adhäsion

Tissue Faktor (TF) ist ein Transmembranprotein, das den extrinsischen Pfad der Koagulation durch Formierung eines Enzymkomplexes mit Faktor VII/VIIa initiiert. Nur aktivierte Monozyten exprimieren TF (Lo et al. 1995). Die durch TF vermittelte vermehrte Adhäsion wird nicht durch Antikörper gegen VLA-4, ICAM-1 oder CD11/CD18 geblockt. In arteriosklerotischen Plaques exprimiert ein erhöhter Anteil der Monozyten TF.

AT1-AK induzieren neben den von uns untersuchten Adhäsionsmolekülen auch über spezifische Bindung an den AT1-Rezeptor die funktionell aktive Expression von TF (Dechend et al. 2000, Theuer et al. 2002). Nagata et al. 2001 belegt, daß sowohl AT1-AK als auch AT direkte Regulatoren der TF-Synthese sind. Die Blockierung von Tissue Faktor bewirkt eine Adhäsionsverminderung bei mit LPS oder AT1-AK stimulierten Monozyten (Randolph et al. 1998). Wir vermuten, daß AT1-AK in einer Gruppe von Hypertoniepatienten für die Aktivierung von TF auf Monozyten und die folgende Hyperkoagulation verantwortlich zeichnen könnten. Da lt. Randolph et al. 1998 TF auch biologische Funktionen in Zell-Adhäsion und Migration hat, besteht die Möglichkeit, daß AT1-AK auch über diesen Weg zur Pathogenese der Arteriosklerose beitragen. TF wurde in der vorliegenden Studie nicht bestimmt, ist aber Gegenstand weiterer Arbeiten der Arbeitsgruppe.

5.6. Wirkung von Abciximab auf MAC-1 isolierter Monozyten

Leukozyten und Thrombozyten haben einen wichtigen Anteil an der Pathogenese von Arteriosklerose. Dabei scheint die Bindung von MAC-1 (CD11b/CD18) auf Monozyten an das Integrin ICAM-1 (CD54) auf Endothelzellen von zentraler Bedeutung für die Monozytenrekurtierung zu sein. Für die Thrombusformation ist das Integrin Glykoprotein IIb/IIIa durch Bindung an Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor wesentlich.

Viele Studien bemühen sich um die Identifizierung von Antagonisten, welche die pathologischen Adhäsionsvorgänge von Monozyten und Thrombozyten beeinflussen könnten. Im Rahmen der Angina pectoris Therapie hat der Thrombozytenaggregationshemmer Abciximab eine deutliche Mortalitätssenkung bewiesen (Hamm et al. 2000). Dabei ist der Antikörper nicht nur spezifisch gegen den Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor gerichtet, sondern interagiert auch mit MAC-1 auf der Monozytenoberfläche (Simon et al. 1997). Die Interaktion mit MAC-1 scheint dabei die Monozytenadhäsion an Fibrinogen und an ICAM-1 auf den Endothelzellen zu mindern. Damit hat Abciximab direkten Einfluß auf die Monozytenrekrutierung,

Eine Anzahl von Studien belegt, daß die MAC-1 Expression auf Monozyten nach Myokardinfarkt oder Koronarangioplastik für mindestens 1 Woche erhöht und unter Abciximab Therapie reduziert ist (Coller et al. 1999, Mickelson et al. 1999).

MAC-1 erfährt eine Konformationsänderung durch Stimulation mittels verschiedener Agonisten wie z.B. Adenosin Diphosphat (ADP), fMLP (Kereiakes et al. 2000, Altieri et al. 1998), inflammatorische Stimulanzen oder Mn^{2+} -Ionen (Plescia et al. 1998). Nur in dieser aktivierten Konformation bindet Abciximab.

Lt. Konstantopoulos et al. 1998 erfolgt im Vollblut Plättchen vermittelte Aggregation in Abwesenheit eines exogenen Stimulus, während isolierte Neutrophile nur nach Stimulation aggregieren. Dieser Effekt ist durch die stimulierende Wirkung von Plättchenadhäsion an Monozyten und die resultierende erhöhte MAC-1-Expression erklärbar (Neumann et al. 1999). Abciximab erniedrigt die MAC-1 Expression auf Monozyten im Vollblut, nicht aber auf isolierten, unstimulierten Monozyten (Mickelson et al. 1999).

In unseren Versuchen erhöht die Inkubation mit Abciximab bei unstimulierten Monozyten CD11b, CD54, CD44, CD31 und CD29 geringfügig. Zu vermuten ist deshalb eine leichte unspezifisch aktivierende Wirkung von Abciximab auf unstimulierte Monozyten. Dem entspricht eine erhöhte Adhäsion in vitro durch Abciximab lt. Frederikson et al. 2000. Die verwendeten Konzentrationen von Abciximab liegen wesentlich über der klinischen Konzentration und sind eventuell toxisch. Fraglich bleibt deshalb die klinische Relevanz dieser geringen in vitro Adhäsionsmolekülveränderungen. Die Anwendung von Abciximab sollte nur bei eindeutiger Indikation diskutiert werden.

Die Bindung von Abciximab erfordert aktivierte Monozyten und erfolgt an die αM (CD11b)–Untereinheit, wobei inflammatorische Stimulanzen die nötige Konformationsänderung bewirken können (Plescia et al. 1998). In unseren Versuchen wird der LPS bedingten Anstieg der CD11b-Expression durch Abciximab deutlich vermindert. Die LPS bedingte Erhöhung der CD54-Expression wird durch Abciximab nicht beeinflusst, da keine Kreuzreaktivität mit diesem Adhäsionsmolekül besteht. Auch CD11a bleibt unter Abciximab Inkubation konstant.

Abciximab ist der einzige Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor Antagonist, der eine Erhöhung der Lebensdauer nach perkutaner Koronarintervention in kontrollierten klinischen Studien beweisen konnte (Frederickson et al. 2000). Die Überlegenheit von Abciximab gegenüber anderen Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antikörpern (z.B. Eptifibatide oder Tirofiban) kann an der unterschiedlichen Kinetik, an spezifischen Bindungsstellen des Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptors

sowie an der zusätzlichen Affinität von Abciximab zu MAC-1 und dem Vitronectin-Rezeptor liegen (Kereiakes et al. 2000). Es ist davon auszugehen, daß Abciximab neben der Thrombusformation auch die Proliferation und Migration von Monozyten beeinflussen kann.

Da Monozyten mit sehr hoher Affinität an Plättchen binden, ist die Möglichkeit von kontaminierenden, an Monozyten gebundenen Plättchen nach Isolierung schwer auszuschließen. Die durch Abciximab reduzierte, an Monozyten gebundene Plättchenmasse führt zu weniger parakriner oder direkter Rezeptorstimulation der Leukozyten und somit zu geringerer MAC-1 Expression (Neumann et al. 1999). Es ist aber anzunehmen, daß der beobachtete Effekt unabhängig von Plättchenkontamination ist, da die Stimulation von Vollblut mit LPS keinen Einfluß auf die Leukozyten-Plättchen-Interaktion hat (Neumann et al. 1999).

Unklar bleibt, ob MAC-1 die Konformation, an die Abciximab binden kann, während physiologischer Prozesse annimmt. Wir haben eine Aktivierung von MAC-1 bei essentieller Hypertonie belegt. Die Blockade der aktivierten Konformation von MAC-1 durch Abciximab könnte somit eventuell zur Verbesserung der Therapie von Hypertonie beitragen. Da die Anwendung von Abciximab kostenintensiv ist und unter sorgfältiger Kontrolle intravenös erfolgen muß, sowie neben der Blutungsgefahr als Nebenwirkung auch zu Hypertonie und Erhöhung der Herzfrequenz führen kann, bleibt dieser Therapieansatz vorerst zur Langzeitbehandlung der Hypertonie hypothetisch. Dagegen ist der Einsatz von Abciximab zur Senkung der Komplikationsrate nach Myokardinfarkt und Koronarangioplastik etabliert. Weitere Studien sollten Aufschluß über den Stellenwert der MAC-1 vermittelten Hemmung der Monozytenadhäsion in der Therapie kardiovaskulären Krankheiten geben.

6. Zusammenfassung

HINTERGRUND: Immunpathologische Mechanismen können an der Pathogenese der Hypertonie mit ihrer Hauptkomplikation, der Arteriosklerose, beteiligt sein. Monozyten des peripheren Blutes sind bei Bluthochdruck unabhängig von Endothelzellschäden voraktiviert. Arteriosklerose entsteht teilweise unabhängig von der Blutdruckhöhe, aber in Abhängigkeit vom Aktivierungsgrad des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Angiotensin II (AT) und agonistische Angiotensin II Rezeptor Typ I-Autoantikörper (AT1-AK) können einen regulativen Einfluß haben und sind direkt in den Prozeß der Monozytenaktivierung involviert.

Das Ziel dieser Studie bestand darin, die mögliche Rolle von zirkulierenden humanen Monozyten bei essentieller Hypertonie in der Pathologie der Arteriosklerose zu untersuchen. Da die Interaktion von Monozyten und Endothel abhängig von der Aktivierung einer Kaskade verschiedenster Adhäsionsmoleküle ist, wurde deren Expression auf Monozyten bestimmt. Der Nachweis von Adhäsionsmolekülveränderungen belegt Aktivierung und ist ein Bindeglied zwischen Hypertonie und Arteriosklerose.

Wir haben das Verteilungsmuster unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle auf isolierten Monozyten des peripheren Blutes von Normalkontrollen und Hypertonikern verglichen. Die Adhäsionsmolekül-Veränderungen isolierter Monozyten bei AT-, AT1-AK- und LPS-Stimulation wurden bestimmt. Als mögliche therapeutische Interaktion untersuchten wir den Einfluß des AT1-Rezeptor-Antagonist Losartan und des auch an MAC-1 bindenden Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor-Antikörper Abciximab auf die Adhäsionsmolekülexpression stimulierter Monozyten.

METHODIK: Blutproben von 18 Patienten mit essentieller Hypertonie und 20 gesunden Normalkontrollen wurden verglichen. Die Monozyten wurden mittels Dynabead-Negativ-Isolierung gewonnen. Die Adhäsionsmolekül-Expression wurde auf unstimulierten und stimulierten Monozyten nach Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD11a, CD11b, CD29, CD31, CD44, CD49d, CD54 und CD62L mittels FACS Messung bestimmt.

ERGEBNISSE:

- Alle Isolierungsmethoden für Monozyten verändern die Expression von Adhäsionsmolekülen, insbesondere durch die Dichte-Gradienten-Zentrifugation. Die Dynabead-Negativ-Isolierung und die Inkubation in Suspension vermeiden Aktivierung durch Adhärenz. Mit der Inkubation erhöht sich die Expression von CD44 und CD54 signifikant, wogegen die Expression von CD11b, CD31 und CD49d erniedrigt wird. Die CD11a Expression bleibt unabhängig von der Inkubationszeit konstant. Die Inkubation zeigt somit ein spezifisches Muster der Adhäsionsmolekülveränderungen.
- Direkt nach Isolierung ist auf Monozyten hypertensiver Patienten das Niveau der Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b und CD54 signifikant und tendenziell auch CD49d erhöht. CD11a, CD11b und CD54 Expression korrelieren signifikant mit dem diastolischen Blutdruck. Essentielle Hypertonie ist somit durch aktivierte Monozyten gekennzeichnet.
- LPS-Stimulation führt zu einer signifikanten Erhöhung der CD11b- und CD54-Expression. CD31 wird niedriger exprimiert. Bei Hypertonie besteht eventuell eine gesteigerte Empfindlichkeit auf LPS. LPS bewirkt als physiologischer Stimulus eine typische Monozyten-Aktivierung und ist eventuell in der Pathologie der Arteriosklerose ein Cofaktor.
- Ausdruck der Aktivierung durch AT Stimulation ist eine erhöhte CD11b Expression auf Monozyten. Bei Krankheiten mit aktiviertem RAS könnte diese erhöhte Expression des ICAM-1 Ligandens auf Monozyten zu nachfolgenden Gefäßschäden führen.
- AT1-Autoantikörper erhöhen die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b, CD54 und CD49d signifikant. Auf CD11a, CD31, CD44 und CD62L ist kein Einfluß zu beobachten. AT1-AK bewirken somit eine Aktivierung der Adhäsionsmoleküle, die den Veränderungen bei Hypertonie ähnliche ist, sich jedoch von den durch LPS oder AT bewirkten Änderungen unterscheidet. Unterschiedliche Aktivierungswege sind deshalb anzunehmen.
- Losartan verringert nur tendenziell und teilweise die AT und AT1-AK bedingten Expressionsveränderungen. Dabei existieren vermutlich zusätzlich AT1-Rezeptor-unabhängige (z.B. über Cyclooxygenasehemmer vermittelte) und Adhäsionsmolekül-unabhängige (z.B. Tissue Faktor vermittelte) Wege der Adhäsionsverminderung.
- Der LPS bedingte Anstieg der CD11b-Expression auf Monozyten wird durch Abciximab deutlich vermindert.

SCHLUSSFOLGERUNG: Wir demonstrieren zum ersten Mal, daß Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie unabhängig von Endothelzellschäden ein spezifisch verändertes Muster der Expression von Adhäsionsmolekülen aufweisen. LPS, AT und AT1-AK sind potente Aktivatoren isolierter Monozyten des menschlichen Blutes und in der Lage, die Expression von Adhäsionsmolekülen in jeweils spezifischer Weise zu beeinflussen. Die nachgewiesene Expressionserhöhung von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten bei Bluthochdruck unterstützt die Hypothese einer inflammatorischen Genese von Hypertonie und Arteriosklerose und ist für die Pathogenese der vorzeitigen und vermehrten arteriosklerotischen Läsionen bei essentieller Hypertonie von Bedeutung. Hypertonie kann als Prozeß veränderter Immunmechanismen mit voraktivierten Monozyten verstanden werden. Denkbar sind z.B. eine Sensibilisierung auf LPS Stimulation, inflammatorische Stimulation durch AT bei Hypertonie mit aktiviertem RAS-System oder bei gesteigerter Empfindlichkeit des AT1-Rezeptors sowie agonistische AT1-Autoantikörper. Primär aktivierte und vermehrt adhärente Monozyten sind somit neben Endothelzellläsion ursächlich an der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen bei Hypertonie beteiligt.

Abciximab könnte über eine erniedrigte CD11b-Expression bei aktivierten Monozyten die erhöhte Adhäsion hemmen. Die Verringerung von AT oder AT1-AK bedingter Monozyten-Aktivierung durch AT1-Rezeptor-Antagonisten ist ein möglicher zusätzlicher therapeutischer Ansatz zur Vermeidung vaskulärer Schäden bei Hypertonie.

Zusammenfassend stellt Tab. 21 die in dieser Studie bestimmten Adhäsionsmoleküle auf Monozyten und die beobachteten Expressions-Änderungen dar.

CD	11a	31	44	62L	11b	54	49d	29
MW Hyp	34	60	125	12	275	65	59	ca. 110
NK	47				417	95	74	
Hypertonie	+	0	0	0	+	+	(+)	0
~RRdia	+	0	0	0	+	+	0	0
~Alter	+	0	0	0	0	0	0	0
Inkubation	0	-	+	(-)	-	+	(-)	~
AT	0	0	0	(-)	+	(-)	0	~
AT1-AK	0	0	0	(-)	+	+	+	~
LPS	0	-	0	(-)	+	+	0	~
ReoP+LSP	0				-	(+)		

Tabelle 21: Änderung der Adhäsionsmolekülexpression auf Monozyten durch Hypertonie, Inkubation, Stimulanz mit AT, AT1-AK, LPS:

0:	unverändert	~:	Erhöhung und Erniedrigung möglich
-:	signifikant erniedrigt	+:	signifikant erhöht
(-):	tendenziell erniedrigt	(+):	tendenziell erhöht
MW:	sofort nach Isolierung bestimmter Mittelwert der MFI bei NK und Hypertonikern		
~:	Korrelation mit diastolischem Blutdruck (RRdia) und Alter (+: positiv)		
ReoP+LPS:	mit Abicimab vorinkubierte LPS simulierte Monozyten im Vergleich zu mit LPS stimulierten Monozyten		

7. Abkürzungsverzeichnis

AA:	Autoantikörper
AB:	Antibiotika
AK:	Antikörper
AKHOCH:	Stimulation mit hohen Konzentrationen an AT1-AK
AT:	Angiotensin II
APC:	Allophycocyanin-Fluoreszenzfarbstoff
AT1:	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
BSG:	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD:	Cluster of Differentiation
CRP:	C-Reaktives-Protein
DiaRR:	diastolischer Blutdruck
FACS:	Fluoreszenz-absorbent-Cell-Sorter
FCS:	Fetales Kälber Serum
FITC:	Flourescine Isothiozyanat-Fluoreszenzfarbstoff
FL:	Fluoreszenz
fMLP:	N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin
FSC:	forward light scatter im FACS
G:	Gate-Bereichsdefinition im FACS
HSA:	Humanes Serum Albumin
ICAM:	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL:	Interleukin
ISO:	Isotyp-Antikörper-Färbung
KHK:	Koronare Herzkrankheit
NK:	Normalkontrollen, Natürliche Killerzellen
N:	Versuchsanzahl
NO:	Stickstoffmonoxid
MAC-1:	CD11b/CD18, Integrin
Mean Iso:	Mittelwert der Isotyp-Antikörper-Fluoreszenz
MFI:	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MNZ:	Mononukleäre Zellen
MW:	Mittelwert
LDL :	Low density lipoprotein

LFA-1 :	Lymphocyte function associated antigen-1, CD11a/CD18
LPS:	Lipopolysaccharide
Hyp:	Hypertonie-Patienten
pAVK:	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS:	Phosphat Buffered Saline, Pufferlösung
PE:	Phycoerythrin-Fluoreszenzfarbstoff
PECAM:	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, CD31
PFA:	Paraformaldehyd
PI:	Propidium-Jodid-Färbung
PP:	Polypropylen
PS:	Polystyren
R1-3:	Bereichsdefinition im FACS Histogramm
RAS:	Renin-Angiotensin-System
ReoLPS:	Vorinkubation mit Abicimab (ReoPro) bei LPS Stimulation
RPMI:	Medium von Sigma
RR:	Blutdruck
SSC:	side scatter im FACS
SysRR:	Systolischer Blutdruck
Sig.:	Signifikanz
TF:	Tissue Faktor
TNF:	Tumor Nekrose Faktor
T1:	Inkubationszeit
VLA:	Very Late Antigen, Integrin
Vers.:	Versuch

8. Literaturverzeichnis

Adgey, A.: An overview of the results of clinical trials with Glykoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Am Heart J* 1998; 135(4):43-55.

Aldermann, H.M., Madhavan, S. et al.: Association of the renin-sodium profil with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* 1991; 324: 1098-1104.

Al-Saady, N., Leatham, E., Gupta, S.: Monocyte expression of tissue factor and adhesion molecules: the link with accelerated coronary artery disease in patients with chronic renal failure. *Heart* 1999, 81:134-140.

Altieri, D.C., Edgington, T.S. et al.: A monoclonal antibody reacting with distinct adhesion molecules defines a transition in the functional state of the receptor CD11b/CD18 (MAC-1), *J of Immunology* 1988, 141(8): 2656-2660.

Ammon C., Meyer, S. et al.: Comparative analysis of integrin expression on monocyte derived macophages and monocyte derived dendritic cells. *Immunology* 2000; 100: 364-369.

Arkin, S., Naprstek, B. et al.: Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) on hematopoietic progenitors. *Blood* 1991; 77: 948-953.

Bader, M., Peters, J. et al.: Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 2001; 79(2-3):76-102.

Bataillard, A., Renaudin, C. et al.: Silica attenuates hypertension in Lyon hypertensive rats. *J Hypertens* 1995; 13: 1581-1584.

Bendas, G.: Selektine als neue Zielstrukturen für die Pharmaforschung. internet 1999, GOVI-Verlag.

Buemi, M., Allegra, A., Aloisi, C.: Cold pressor test raises serum concentrations of ICAM-1, VCAM-1, and E-Selectin in normotensive and hypertensive patients. *Hypertension* 1997; 30: 845-847.

CAPTURE Study: Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina. *Lancet* 1997; May 17; 349 (9063): 1429-1435.

Carlos, T., Kovach, N. et al.: Human monocyte bind to two cytokine-induced adhesive ligands on cultured human endothelial cells. *Blood* 1991; 77 (10): 2266-2271.

Chae, C.U., Lee, R.T. et al.: Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001; 38(3): 399-403.

Cheng, J., Wung, B. et al.: Cyclic strain enhances adhesion of monocytes to endothelial cells by increasing intercellular adhesion molecule-1 expression. *Hypertension* 1996, 28: 386-391.

Clozel, M., Kuhn, H., Hefti, F.: Endothelial dysfunction and subendothelial monocyte macrophages in hypertension, *Hypertension* 1991; 18: 132-134.

Coller, B.S. et al.: Potential non-Glykoprotein IIb/IIIa effects of abciximab, *Am Heart J* 1999; 138(1 Pt 2): 1-5.

Couffinthal, T., Duplaa, C. et al.: Effect of low density lipoprotein on monocyte adhesiveness to endothelial cells in vitro. *Atherosclerosis* 1999; 93: 35-45.

Cronstein, B.N., Kimel, S.C. et al.: A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(21): 9991-9995.

DeBount, N., Geijtenbeek, T., Ntea, M.: Integrin mediated adhesion of mononuclear cells from patients with hypercholeemia. *Eur J Clin Invest* 1999, 29(9): 749-57.

Dechend, R., Homuth, V., Wallukat, G.: AT1 Receptor agonist antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor, Franz Volhard Clinic, Berlin, *Circulation* 2000; 101: 2382-2393.

DeGasparo, M., Catt, K.J. et al.: International Union of Pharmacology.XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev 2000; 52: 415-472.

DeSouza, C., Dengel, D., Macko, R.: Elevated levels of circulating cell adhaesions molecules in uncomplicated essential hypertension. J Hypertens 1997; 10:1335-1341.

Deutsche Hochdruckliga, Stellungsnahme zur aktuellen Diskussion über die medikamentöse Hochdrucktherapie. Juni 2003, Therapieempfehlungen Nov. 2002, Homepage der Deutsche Hochdruckliga.

Dörffel, Y.: Rolle peripherer Monozyten bei Patienten mit essentieller Hypertonie. Habilitation. 2002. HU-Berlin.

Dörffel, Y., Franz, St., Pruß, A., Neumann, G., Rhode, W., Burmester, G., Scholze, J.: Preactivated monocytes from hypertensive patients as a factor for atheroclerosis? Atherosclerosis 157, 2001:151-160.

Dörffel, Y., Lätsch, Ch. Stuhlmüller, B., Schreiber, St., Scholze, S., Burmester, G., Scholze, J.: Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. Hypertension 1999; 34 :113-117.

Dougherty, G.J., Murdoch, S., Hogg, N.: The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an imune response. Eur. J. Immunol. 1988; 18: 35-39.

Faas, M., Schuiling, G., Linton, E.: Activation of peripheral leucocytes in rat pregnancy and experimental preeclampsia. Am J of Obstetrics and Gynecology 2000, 182: 351-357.

Frederickson; B.J.; Turner; N.A. et al.: Effects of abciximab, ticlopidine, and combined abicimab/ticlopidine therapy on platelet and leucocyte function in patients undergoing coronary angioplasty, Circulation 2000, 101(10):1122-1137.

Fritsch, P.: Dermatologie und Venerologie. Springer 1998.

Fu, M.L. et al.: Autoantibodies against angiotensin receptor (AT1) in patients with hypertension. J Hypertens 2000; 18: 945-953.

Fukai, T., Siegfried, M. et al.: Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. Circ Res 1999, 85: 23-28.

Hahn A.W.A., Jonas, F., Bühler F.R., Resink, T.J.: Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. FEBS Lett 1994; 347: 178-180.

Hamm, C. Neue Thrombozytenaggregationshemmer in der Therapie der instabilen Angina. Z Kardiol 2000; 89: 1053-1056.

Haugen, T. S., Skjonsberg, O., Nakstad, B.: Modulation of adhesion molecule profiles on alveolar macrophages and blood leukocytes. Respiration 1999, Nov. 66(6): 528-37.

Hentzen, E.R., Neelamegham, S. et al.: Sequential binding of CD11a/CD18 and CD11b/CD18 defines neutrophil capture and stable adhesion to intercellular adhesion molecule-1, Blood 2000, 95(3): 911-920.

Hilme, E. , Hansson, L. et al.: Abnormal immune function in malignant hypertension. J Hypertens 1993; 11: 989-994.

Homuth, V., Dechend, R. et al.: Autoantikörper gegen den Angiotensin AT1-Rezeptor sind im Tiermodell einer malignen Hypertonie am kardiovaskulären Endorganschaden beteiligt. Workshop. Thieme Verlag. ZGN 2001.

Homuth, V., Wallukat, G. et al.: Charakterisierung von agonistischen Autoantikörpern gegen den AT1-Rezeptor bei Patientinnen mit Präeklampsie und HELLP-Syndrom. Speculum 2000, 18: 6-14.

JNC-VII (Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure) 2003, JNC-VI 1997, Report vom Server des National Heart Lung and Blood Institute.

Kalra, V.K., Ying, Y. et al. : Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1994; 160: 154-162.

Kannel, W.B.: Epidemiology of coronary atherosclerosis: post mortem vs clinical risk factors correlations. The Framingham Study. In: Gotto AM Jr, Smith L. *Atherosclerosis*. Springer Verlag, New York, 1980: 54-56.

Keidar, S.: Angiotensin, LDL peroxidation and atherosclerosis. *Life Sci* 1998; 63: 1-11.

Kereiakes, D.J., Runyon, J. P. et al.: Iib's are not Iib's, *The American Journal of Cardiology* 2000, 85(8 Supplement1): 23-31.

Kleimann, N.S. et al.: A risk-benefit assesment of abciximab in angioplasty, *Drug Saf* 1999, 20(1): 43-45.

Kiarash, A., Pagano, P., Tayeh, M.: Upregulated Expression of rat heart intercellular adhesion molecule-1 in angiotensin-II- but not Phenylephrine- induced hypertension. Henry Ford Hospital. Detroit.

Kim, J., Berliner, J., Nadler, J.: Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 24; 226 (3): 862-868.

Kim, J., Chopp, M., Chen, H.: Adhesive Glykoproteins CD11a and CD18 are upregulated in the leucocytes from patients with ischemic stroke and transient ischemic attacks. *J Neurol Sci* 1995; 128(1):45-50.

Komatsu, S., Panes, J., Russell, J.: Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997; 29: 683-689.

Konstantopoulus, K., Neelamegham, S. et al.: Venouse levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and β 2-integrin, *Circulation* 1998; 98: 873-882.

Kranzhöfer, R., Browatzki, M. et al.: Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor κ B in human monocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications 1999, 253: 826-828.

Kubitschek, J. H.: HOPE-Studie, ACE Hemmer RAMIPRIL revolutioniert die Herztherapie. Bericht vom Kongreß der AHA. Internet 2000.

Landmann, R., Scherer, F. et al.: LPS directly induces oxygen radical production in human monocytes via LPS binding protein and CD14. J Leukoc Biol 1995; 57: 440-449.

Lang, R., Karow, Th.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Bergisch-Gladbach. 2000.

Langstein, J., Becke, F.M., Sollner, L. et al.: Comparative analysis of CD137 and LPS effects on monocyte activation, survival and proliferation. Biochem Biophys Res Commun 2000; 273:117-122.

Lenter, M., Uhlig, H., Hamann, A.: A monoclonal antibody against activation epitope on mouse integrin chain β 1 blocks adhesion of lymphocytes to the endothelial integrin α 6 β 1. Cell Biology 1993; 90: 9051-55.

Leung, P.S., Tsai, S.J., Wallukat, G. et al.: The upregulation of angiotensin II receptor AT(1) in human preeclamptic placenta. Mol Cell Endocrinol 2001; 184(1-2):95-102.

Ley, K.: Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. Cardiovasc Res 1996; 32(4):733-742.

Ley, K.: Selektine und Integrine bei Ischämie und Arteriosklerose. Vortrag Deutsches Rheumaforschungszentrum.Berlin 2001.

Lilly : Firmeninformation: <http://www.reopro.com/US/science/>

Linz, W. : Long-term angiotensin II type 1 receptor blockade doubles lifespan of hypertensive rats. Hypertension 2000; 35: 908.

Liu, Y., Liu, T., McCarron R., Spatz, M.: Evidence for activation of endothelium and monocytes in hypertensive rats. *Am J Physiol* 1996 Jun, 270: H2125-2131.

Lo, S., Cheung, A., Zheng, Q.: Induction of tissue factor on monocytes by adhesion to endothelial cells. *J of Immunology* 1995, 154: 4768-4777.

Lopes-Virella, M. et al.: Immunological and microbiological factors in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Immunology* 1985; 37: 377-386.

Lüschnner, T., Noll, G. et al.: The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118:81-90

Luft, F.C.: Angiotensin, inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 2001; 3(1): 61-67.

Luft, F.C.: Hypertension as a complex genetic trait. *Semin Nephrol* 2002; 22(2):115-126.

Lundahl, J., Skold, C. et al.: Monocyte and neutrophil adhesion to matrix proteins is selectively enhanced in the presence of inflammatory mediators. *Scand J Immunol* 1996 Aug ; 44(2): 143-149.

Luscinskas, F. et al.: Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-Selektin, $\beta 1$ Integrins and $\beta 2$ integrins. *J of cell biology* 94; 125: 1417-1427.

Luther, H., Homuth, V., Wallukat, G. et al.: Alpha-1-adrenergic receptor antibodies in patients with primary hypertension. *Hypertension*. 1997, 29(2): 678-82.

Macey, M., McCarthy, D. et al. : Effects of cell purification methods on CD11b and L-Selektin expression as well as the adherence and activation of leucocytes. *J Immunol Methods* 1995; 181(2):211-219.

Masuda, M., Takahashi, H. et al.: Adhesion of leukocytes to endothelial cells in atherosclerosis. *Rinsho Byori* 1998 Nov, 46(11): 1149-1155.

McCarron, R., Wang, L., Siren, A.: Monocyte adhesion to cerebrovascular endothelial cells derived from hypertensive and normotensive rat. *Am J Physiol* 1994; 267: H2491-H2497.

Meniconi, A. et al.: Ist die Arteriosklerose eine Infektionskrankheit? *Praxis* 1998; 87: 64-74.

Meisel, S., Shapiro H., Radnay, J.: Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules LFA-1 and MAC-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31(1):120-125.

Mervaala, E.M., Muller, D. et al.: Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Franz Volhard Clinic. Hypertension* 1999, 33, 1Pt 2: 389-395.

Mervaala, E.M., Muller, D., Dechend, R. et al.: Cyclosporin A protects against angiotensin II-induced end-organ damage in double transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2000; 35: 360-366.

Mickelson, J.K., Ali, M.N. et al.: Chimeric 7E3 Fab (ReoPro) decreases detectable CD11b on neutrophils from patients undergoing coronary angioplasty, *JACC* 1999; 33(1): 97-106.

Mills, P., Farag, N. et al.: Peripheral blood mononuclear cell CD62L and CD11a expression and soluble interstitial cell adhesion molecule-1 levels following infused isoproterenol in hypertension. *J Hypertension* 2002; 20 (2): 311-316.

Muller, D., Dechend, R. et al.: Angiotensin-induced inflammation and novel approaches to treatment. *Adv Nephrol Necker Hosp* 2001; 31: 89-103.

Muller D., Heissmeyer, V. et al.: Aspirin inhibits NF- κ B and protects from angiotensin II-induced organ damage. *Faseb Journal* 2001, 15 (10):1822-1828

Muller, D.N., Mervaala, E.M., Luft, F.C. et al.: Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am J Pathol.* 2002 Nov; 161(5):1679-1693.

Muller, W.A., Randolph, G.J. et al.: Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol* 1999 Nov; 66(5): 698-704. Review.

Nagata, K. et al.: Effects of blockade of the renin – angiotensin system on tissue factor and plasminogen activator-1 synthesis in human cultured monocytes. *J Hypertens* 2001; 19: 776-789.

Nakashima, Y. et al.: Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites. *Arteriosclerosis, Thrombosis and vascular biology*. 1998; 18: 842-851.

Neumann, F.J., Zohlnhofer D. et al.: Effect of Glykoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin MAC-1 in acute myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol* 1999; 34 (5):1420-1426.

Nickening, G. , Böhm, M. et al.: Bedeutung des Angiotensin-II-Rezeptors AT1 für die Entstehung von arterieller Hypertonie und Arteriosklerose. *Dtsch. med. Wschr.* 1997; 122: 1009-1013.

Plescia, J., Conte, M.S. et al.: Molecular identification of the cross-reacting epitope on α M β 2 Integrin I Domain recognized by the Anti- α IIb β 3 monoclonal antibody 7E3 and its involvement in leucocyte adherence. *J of Biological Chemistry* 1998, 273(32): 20372-20377.

Potter, D. D., Sobey C.G. et al.: Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain Angiotensin II. *Circulation* 1998; 98: 800-807.

Randolph, G.J. , Luther, T., Muller, et al.: Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood* 1998; 92(11): 4167-4177.

Roitt, I, Brostoff, J., Male, D.: *Immunology*. Mosby-Verlag. London 1998.

Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362: 801-809.

Ross, R.: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 38: 71-79

Rubio, M., Sotillos, M., Jochems, G. et al.: Monocyte activation: rapid induction of $\alpha 1/\beta$ (VLA4) integrin expression by LPS and interferon. *Eur J Immunol.* 1995 ;25 :2701-2705.

Scannell, G., Waxmann, K. et al.: Hypoxia-induced alteration of neutrophil membrane receptors. *J Surg Res* 1995; 59: 141-145.

Schmitz, G., Herr, Rothe et al.: T-Lymphozyten und Monozyten in der Pathogenese der Arteriosklerose. *Herz* 1998; 23: 168–177.

Scholze, J.: Hypertonie. Risikokonstellationen und Begleiterkrankungen. Blackwell Wissenschaftsverlag. Berlin, Wien 1999.

Shen, Y., Rattan, V.: Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transmigration of monocytes. *Am J Physiol* 1996; 270: H1624-1633.

Simon, B., Noll, Maisch et al.: Endotheliale Dysfunktion - eine Bestandsaufnahme und Ansätze zur Therapie. *Herz* 1999; 24: 62 – 71.

Simon, D.I., Xu, H. et al. : 7 E3 monoclonal antibody directed against the platelet Glykoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leucocyte integrin MAC-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(3): 528-535.

Spiering, W, Kroon, A. et al.: Angiotensin II sensitivity is associated with the angiotensin II type 1 receptor A(166)C polymorphism in essential hypertensives on a high sodium diet. *Hypertension* 2000, 36: 411-416.

Stent, G., Crowe, S.M. et al.: Effects of monocyte purification and culture on integrin expression. *APMIS* 1997; 105: 663-670.

Stohlawetz, P., Hahn, P., Koller, M.: Immunophenotypic characteristics of monocytes in elderly subjects. *Scand J Immunol* 1998; 48(3): 324-326.

Strawn, W., Gallagher, P., Talant, E.: Angiotensin II AT 1–Rezeptor blockade inhibits monocyte activation and adherence in transgenic (mRen2)²⁷ rats. J of Cardiovascular pharmacology 1999; 33: 341-351.

Suzuki, K., Masawa, N. et al.: The pathogenesis of cerebrovascular lesions in hypertensive rats. Med Elektron Microsc 2001; 34(4): 230-239.

Theuer, J., Dechend, R. et al.: Angiotensin II induced inflammation in the kidney and the heart of double transgenic rats. BMC Cardiovascular Disorders 2002, 2:3.

Tsao, Ph. et al.: Interaction of diabetes and hypertension on determinants of endothelial adhesiveness. Arteriosclerosis, Thrombosis and vascular biology 1998; 18: 947-953.

Tummala, P., Chen, X., Sundell, C.: Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculatur. Circulation 1999; 100: 1223-1229.

Violi, F. et al.: Relation between risk factors and cardiovascular complications in patients with peripheral vascular disease. Results from the A.D.E.P. study. Atherosclerosis 1996; 120: 25-35.

Vogel, R.A.: Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis. Clin. Cardiol. 1997; 20: 426-432.

Wallukat, G., Homuth, V., Fischer, TH. et al.: Patients with preeclampsia develop agonist autoantibodies against the angiotensin AT1 Rezeptor, J Clin Invest 1999; 103: 945-952.

Wambach, G., Fritschka, E.: Arterielle Hypertonie und vaskuläres System. Upjohn GmbH. 1994

Wernicke, K.: Medizinische Biometrie, Scriptum, Institut für Medizinische Biometrie HU Berlin. 1999.

WHO/ISH: Guidelines for Management of Hypertension. J of Hypertension 1999; 17(1): 151-183.

Wick, G. et al.: Is arteriosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 1995; 16(1): 27-33.

Xiong, H. et al.: The expression of CD11a and CD11b on leucocytes in cerebral thrombosis, *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 1998 Dec; 29(4): 415-417.

Yusuf, S., Sleight P. et al.: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; Jan 20, 342(3): 145-153.

9. Danksagung

Meiner Betreuerin Privatdozentin Dr. med. Yvonne Dörffel danke ich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die vorbehaltlose Unterstützung, die fruchtbaren Diskussionen und freundlichen Ermutigungen sowie die großzügigen Möglichkeiten zur Durchführung der Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. J. Scholze danke ich für die Unterstützung, das Korrekturlesen der Arbeit und die Organisation der Patienten.

Für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die Unterstützung in der täglichen Laborarbeit sowie die freundliche Arbeitsatmosphäre danke ich insbesondere allen Mitarbeitern des Institutes für Transfusionsmedizin der Charité unter Axel Pruß.

Insbesondere Uta Syrbe und den Mitarbeitern des Deutschen Rheumaforschungszentrums um Prof. Dr. A. Hamann gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung des FACS-Gerätes, die umfangreiche freundliche Einarbeitung, zahlreichen Anregungen und immerwährende Offenheit für Problemdiskussionen sowie das Korrekturlesen der Arbeit.

Meinen Dank für die AT1-Antikörper Bereitstellung an Prof. Dr. G. Wallukat und an Dr. Schulze vom Max Delbrück Zentrum für Molekularmedizin Berlin Buch für die Unterstützung bei der Erarbeitung der Methoden der mikroskopischen Immunfluoreszenz.

Für die Einarbeitung in die Laborarbeit und Organisation von Hypertonie-Patienten danke ich meinem Mitdoktoranden Nicolai Bochning.

Die Arbeit ist meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Eidesstattliche Versicherung

Gemäß der Promotionsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich an Eides statt:

- daß die vorliegende Arbeit von mir selbst ohne fremde Hilfe verfasst und die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden
- daß die vorliegende Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt
- daß die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern sowie benutzten Hilfsmittel und Literatur vollständig angegeben sind
- daß keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind
- daß weder früher noch gleichzeitig Promotionsvorhaben angemeldet wurden

Ich habe die Dissertation unter Betreuung von Privatdozentin Dr. med. Yvonne Dörffel der Poliklinik für Innere Medizin der Medizinischen Fakultät der Charité, Prof. Dr. J. Scholze, in folgenden wissenschaftlichen Einrichtungen angefertigt: Institut für Transfusionsmedizin unter Axel Pruß, Deutsches Rheumaforschungszentrum um Prof. Dr. A. Hamann und Dr. Uta Syrbe, Max Delbrück Zentrum Berlin Buch um Prof. Dr. G. Wallukat und Dr. Schulze.

Berlin, den 01.09.2003

Susan Lau